

Karl Schaffnit

ISOLIERUNG EINES NEUARTIGEN
PHOSPHOLIPIDS AUS WOLFFETT UND
VERSUCHE ZU SEINER
STRUKTURAUFKLÄRUNG

1965

Frankfurt am Main 1966



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554805_0042



Isolierung eines neuartigen Phospholipids aus
Wollfett
und Versuche zu seiner Strukturaufklärung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Karl Schaffnit
aus
Frankfurt am Main
1965

Gedruckt mit Genehmigung
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Dekan : Prof. Dr. H. Lehmann

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Janecke

2. Gutachter: Prof. Dr. C. Rohmann

Tag der mündlichen Prüfung: 18. 2. 1965

Tag der Promotion : 22. 2. 1965

Inhaltsübersicht

	Seite
1 <u>Einleitung</u>	5
1.1 Aufgabenstellung	6
2 <u>Allgemeiner Teil</u>	8
2.1 Übersicht über neuere Substanzen auf dem Gebiet der Phospholipide	8
2.2 Komplexbildung der Phospholipide	17
3 <u>Allgemeiner Versuchsteil</u>	26
3.1 Isolierung von Phospholipid aus Wollfett	26
3.2 Eigenschaften von Phospho-inosito-glyzero-lipid I und Phospho-inosito-glyzero-lipid II	27
3.3 Untersuchungen an Ph I und Ph II	45
3.4 Molekülaufbau	70
3.5 Diskussion	78
4 <u>Beschreibung der Versuche</u>	81
4.1 Isolierung von Ph I und Ph II aus Wollfett	81
4.2 Bestimmung des Phosphorgehaltes der Wollfettsorten und von Ph I und Ph II	82
4.3 Chromatographie der Phospholipide	82
4.4 Untersuchung der Spaltprodukte von Ph I und Ph II	83
4.5 Untersuchungen am Peptidbestandteil von Ph I und Ph II	93
5 <u>Zusammenfassung</u>	96
6 <u>Literaturverzeichnis</u>	97

		Seite
1	<u>Einleitung</u>	5
1.1	Aufgabenstellung	6

Einleitung

In seiner Arbeit, die sich hauptsächlich mit der Autoxydation des Wollfettes beschäftigte, berichtet Senft (1) unter anderem, daß der nachgewiesene Phosphor-Anteil organisch gebunden vorliegt, und der Stickstoff-Anteil sich im wesentlichen in einem Peptidrest vorfindet. Da außerdem Inosit und Glyzerin (letzteres jedoch nur pc in kleinen Mengen) nachgewiesen werden konnten, lag der Gedanke nahe, daß sich im Wollfett wenigstens ein Inositphosphatid befindet. Ein solcher Befund wäre von pharmazeutisch-technologischem Interesse, da man annehmen kann, daß eine Verbindung aus dieser Gruppe an der Emulgierfähigkeit des Wollfettes einen Anteil hat.

Fülberth (2) konnte aus dem Wollfett der Schafe ein nicht übliches Inositphosphatid isolieren, sondern ein Phospholipid, bestehend aus Cholesterin, Phosphorsäure, Inosit, Zucker und einem Peptid. Auf Grund qualitativer analytischer Arbeiten bezeichnete er dieses Phospholipid als ein Phospho-peptido-glykolipid und schlug eine vorläufige Strukturformel vor.

1.1 Aufgabenstellung

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit sollte sein, nach der von Fülberth (2) ausgearbeiteten Methode erneut eine Phospholipid-Fraktion aus Wollfett zu isolieren und quantitativ zu untersuchen, um einen Einblick in den Aufbau des Moleküls zu gewinnen.

2	<u>Allgemeiner Teil</u>	Seite 8
2.1	Übersicht über neuere Substanzen auf dem Gebiet der Phospholipide	8
2.1.1	Glyzerinphosphatide	8
2.1.2	Inositphosphatide	12
2.1.3	Sphingosinphosphatide	14
2.1.4	Sonstige Phosphatide	16
2.2	Komplexbildung der Phospholipide	17
2.2.1	Kräfte, die die Komplexbildung bewirken	17
2.2.1.1	van der Waal'sche Kräfte	17
2.2.1.2	Dipolkräfte	18
2.2.1.3	Ionenbeziehungen	19
2.2.2	Komplexbildung mit Ionen	19
2.2.3	Komplexbildung mit anderen Lipiden	20
2.2.4	Komplexbildung mit Proteinen	21

2 Allgemeiner Teil

2.1 Übersicht über neuere Substanzen auf dem Gebiet der Phospholipide

Fülberth (2) hat schon in seiner Dissertation einen gedrängten Überblick über die bekannten Phosphatide und die ihnen ähnlichen Verbindungen gegeben. Diese Übersicht soll durch neuere Befunde ergänzt werden. Es wird Wert darauf gelegt, nur neu aufgefundene Gruppen herauszustellen. Eine Vollständigkeit wird jedoch nicht angestrebt. Dabei soll die Klassifizierung nach Hanahan (3) wieder benutzt werden.

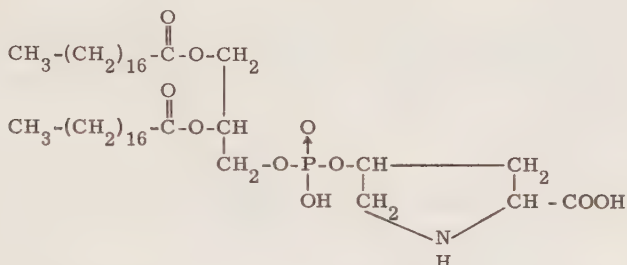
Einteilung der Phospholipide (Phosphatide)

- 1.) Glyzerinphosphatide (Phosphatidylcholin, Phosphatidyläthanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidsäuren, Cardiolipin)
- 2.) Inositphosphatide
- 3.) Sphingosinphosphatide
- 4.) Sonstige Phosphatide

2.1.1 Glyzerinphosphatide

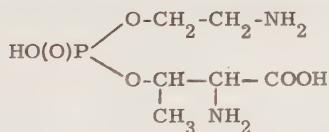
Es erschienen in den letzten Jahren Veröffentlichungen, welche die Isolierung von natürlich vorkommenden Phosphatiden beschreiben, die als stickstoffhaltige Bestandteile verschiedene Peptide enthalten. Die meisten dieser Peptide enthielten am Ende eine Hydroxyamino-säure, meistens Serin. War dieses abwesend, so fand man entweder Hydroxyprolin, Threonin oder Tyrosin als Peptidkomponente. Schrade, Becker und Böhle (4) isolierten z. B. aus Blut 13 Lipopeptide, von denen drei Hydroxyprolin in ihrem Peptidanteil enthielten. In einem der Lipopeptide war es die einzige Hydroxyaminosäure. Sie könnte (ebenso das Threonin und Tyrosin) wie Serin in dem bekannten Phosphatidylserin über ihre Hydroxygruppe mit der Phosphorsäure verbunden sein. Diese Befunde machen das Vorkommen von Phosphatidylhydroxyprolin in der Natur wahrscheinlich.

Eine synthetische Darstellung dieser Verbindung gelang Baer und Zschocke (5)



Distearyl-L- α -glycerylphosphoryl-L-L-hydroxyprolin

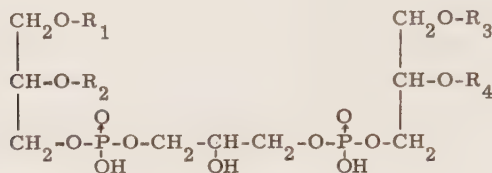
Bei der nächsten Verbindung handelt es sich zwar nicht um ein Glycerinphosphatid, seine Erwähnung ist jedoch im Zusammenhang mit den Ausführungen über Phosphatidylhydroxyprolin von Interesse. Es ist das bisher nicht bekannte L-Threonin-äthanolaminphosphat, das Rosenberg, Ennor, Hagermann und Sugai (6) in Fischen (*Salmo irideus* und *Neoceratodus*) entdeckten.



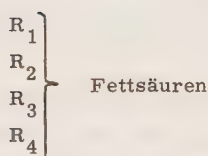
L-Threonin-äthanolaminphosphat

Die Verfasser synthetisierten auch obige Verbindung. Sie stimmte mit der aus Fisch isolierten in Elementaranalyse, Schmelzpunkt, optischer Drehung, Infrarotspektrum und den bei partieller Hydrolyse entstehenden Spaltprodukten überein.

Eine cardiolipinähnliche Substanz konnten Marinetti, Erbland und Stotz (7) aus Schweineherz-Zellfraktionen isolieren.



Cardiolipin

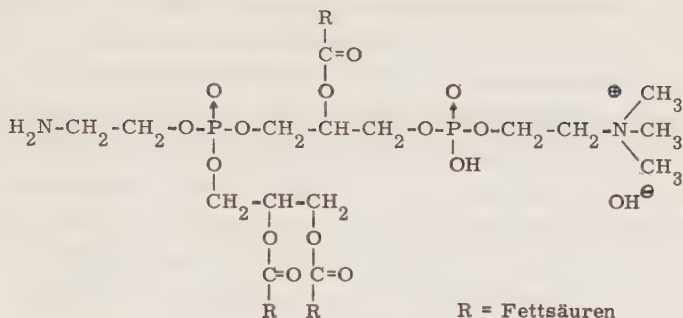


Sie wurde vorläufig als Polyester-glycerin-phosphatid identifiziert und scheint fast ausschließlich in den Mitochondrien vorzukommen. Sie spielt vielleicht eine wichtige Rolle im Stoffwechsel.

Ebenfalls um Polyglyzerinphosphatide handelt es sich bei den Phospholipiden, die Schwarz, Dreisbach, Stambaugh, Kleschick und Barrionuevo (8) in der Kaninchenhaut gefunden haben. Die exakte Struktur dieser Verbindung konnte noch nicht ermittelt werden. Sie sind nach Benson und Maruo (9) sowie Marinetti und Mitarbeiter (10) wahrscheinlich an der Synthese gewöhnlicher Phosphatide beteiligt. - Ferner wurden in Spuren weitere noch nicht näher identifizierte Phosphatide erhalten. Eines davon könnte ein "Lysokephalin" sein.

Collins (11) isolierte aus Rattenleber ein Phospholipid, welches Phosphorsäuretriestergruppen enthält. Es werden zwei Strukturen diskutiert:

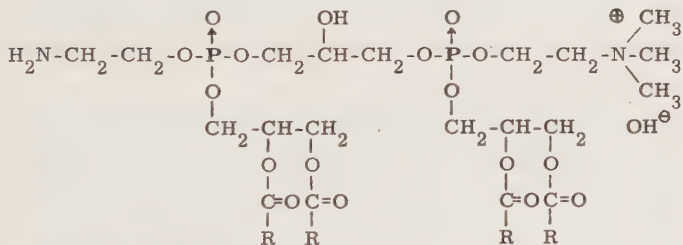
1.)



Phosphatidyläthanolamin-Lysolezithin

Phosphatidyläthanolamin ist hier mit der freien Hydroxylgruppe von Lysolezithin verestert.

2.)



R = Fettsäuren

1-(Phosphatidyläthanolamin)-3-(Phosphatidylcholin)-Glycerin

Die zweite Struktur kann man sich folgendermaßen aufgebaut vorstellen: Phosphatidyläthanolamin ist durch Glycerin oder eine ähnliche Substanz mit einem zweiten Phospholipid verbunden, so daß diese Substanz zwei Phosphorsäuretriestergruppen enthält.

In den letzten Jahren ist mehrfach über das Vorkommen von Lysolezithin in tierischem Gewebe berichtet worden (12, 13, 14). In jedem Fall wurde dieses entweder durch Chromatographie an Kieselsäure oder durch Gegenstromverteilung, bei der Essigsäure als Lösungsmittelkomponente diente, isoliert. Kiesel- und Essigsäure vermögen jedoch das oben beschriebene Phospholipid aufzuspalten, wie der Verfasser zeigen konnte. Es ist also möglich, daß Lysolezithin erst während der Aufarbeitung tierischer Gewebe entsteht und selbst in diesen nicht vorkommt.

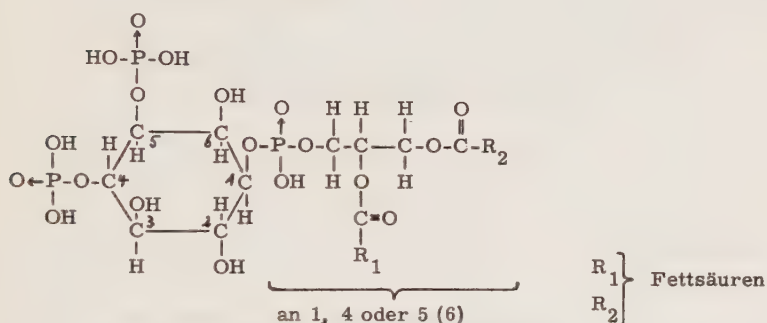
In Schafshirn fand Collins (15) ein offenbar komplizierter gebautes Glycerinphosphatid. Es hatte ein Molekulargewicht von 2030 und enthielt folgende Bestandteile: 2 Mol Glycerin-1-Phosphat, je 1 Mol Äthanolamin, Cholin, eines Zuckers und eines Fettalkohols, 2 Mol Fettsäuren und zwei nicht identifizierte stickstoffhaltige Bestandteile. Der Fettalkohol hatte ein Molekulargewicht von 475 und eine Hydroxylgruppe. Einer der nicht identifizierten stickstoffhaltigen Stoffe war wasserlöslich nach Hydrolyse und enthielt weder freie Amino- noch quarternäre Ammoniumgruppen.

Auf Grund der Gegenwart von 2 Mol Glycerin-1-Phosphat, 1 Mol Äthanolamin, 1 Mol Cholin und 2 Mol Fettsäuren nahmen die Verfasser an, daß Lysophosphatidylcholin und Lysophosphatidyläthanolamin das Grundgerüst des Phosphatids bilden. Es besteht also möglicherweise aus einem Molekül Lysolezithin und einem Molekül Lysophosphatidyläthanolamin, die durch eine Brücke aus den beiden stickstoffhaltigen nicht identifizierten Bestandteilen, dem Zucker und dem Fettalkohol verbunden sind.

2.1.2 Inositphosphatide

Dittmer und Dawson (16) beschrieben die Isolierung eines neuen Inositphosphatids aus Ochsenhirn. Es handelte sich um ein

Triphosphoinositid im Gegensatz zu den schon länger bekannten Mono- und Diphosphoinositiden (3). Es enthielt im Verhältnis 1 : 3 : 1 : 2 Inosit : Phosphorsäure : Glycerin : Fettsäure. Auf Grund eingehender Analysen (schrittweiser saurer und alkalischer hydrolytischer Abbau) kamen die Verfasser zu folgender Strukturformel:

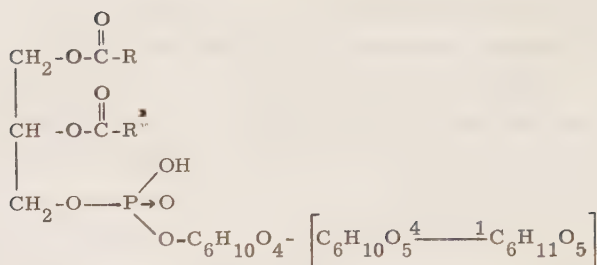


Diacylglycerylphosphorylinosit-diphosphat

Nielsen (17) untersuchte schwer extrahierbare Sojabohnen-Phosphatide. Es handelte sich um solche Phospholipide, die nicht durch unpolare Lösungsmittel extrahiert werden konnten, sondern nur durch Gemische von unpolaren und polaren, z.B. durch Hexan-Äthanol. Die so gewonnenen Phospholipide wurden durch Gegenstromverteilung fraktioniert.

Neben anderen Fraktionen wurde auch eine Glyzero-inosito-phosphatidsäure erhalten, die äquimolekulare Mengen Glycerophosphorsäure und Inositphosphorsäure enthält. Phosphor und Fettsäuren waren im Verhältnis etwa 1 : 2 vorhanden. Erwähnt wurde außerdem noch eine hochmolekulare Phosphatidsäure.

Vilkas (18) beschrieb ein Phosphatidyl-inosito-dimannosid aus Tuberkelbazillen. Er gab folgende Struktur dafür an:



R u. R[•] = Palmitinsäure, Stearinsäure, Hexadecensäure,
Octadecensäure, Tuberkulostearinsäure.

Pangborn (19) isolierte ebenfalls aus Tuberkelbazillen ein Phosphatidyl-inosito-pentamannosid (1,73% P, Inosit 10,5%, Mannose 50%).

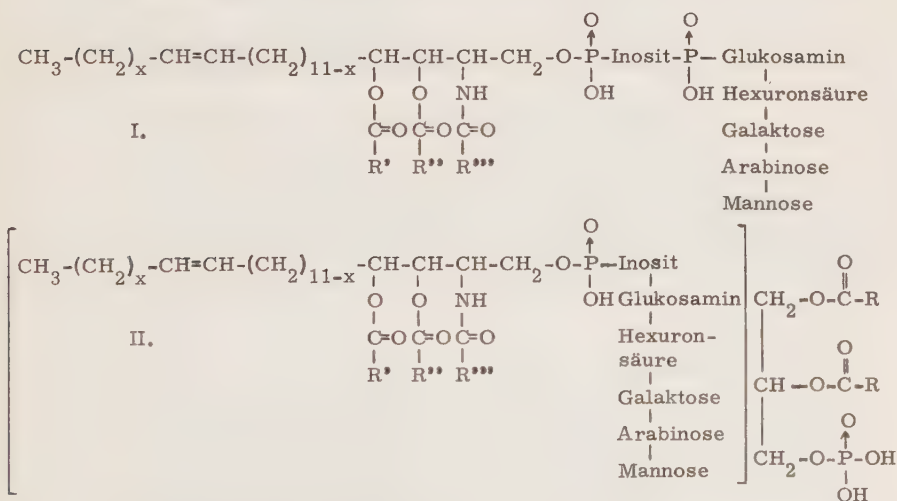
Nojima (20) entdeckte in D-Wachsen (eine Beschreibung der verschiedenen Wachse aus Bakterienlipiden befindet sich in (21)) von BCG (Bacille de Calmette-Guérin = Mycobacterium bovis) Phosphatidyl-inosito-oligomannoside. Er erhielt nach Verseifung Glyceryl-phosphoryl-inosito-, -di-, -tetra- und -pentamannosid-säuren. Nur zwei Fettsäuren wurden bei der Verseifung freigesetzt: Palmitinsäure und eine noch nicht identifizierte Säure, bei der es sich jedoch um Tuberkulostearinsäure handeln könnte.

2.1.3 Sphingosinphosphatide

Durch die bisher auf diesem Gebiet noch nicht angewandte Dünnschichtchromatographie, ein neues papierchromatographisches Verfahren (mit Formaldehyd imprägniertem Papier), Craig-Verteilung und IR-Spektroskopie konnte Wagner (22) verschiedene neue Verbindungen nachweisen, isolieren und identifizieren.

Unter anderem wurde aus Sojalezithin das bereits mehrfach untersuchte Lipopolysaccharid (Phytoglykolipid) der Sojabohne (23) isoliert. Das von Carter und Mitarbeitern (24) durch Alkali-Hydrolyse ge-

wonnene hochgereinigte Produkt setzte sich aus Phytosphingosin, Phosphorsäure, Inosit, Glukosamin, Hexuronsäure, Arabinose, Mannose und Galaktose zusammen. Es entspricht in seiner Zusammensetzung nicht ganz demjenigen, das Wagner (22) durch Craig-Verteilung erhielt. Auffallend war bei dem nach dieser Methode gewonnenen Produkt der um 0,6% höhere Phosphorgehalt, die Gegenwart von Glycerin und mehrerer Fettsäuren (Palmitin-, Stearin-, Linol-, Linolen- und Lignocerinsäure) im Molekül. Somit dürfte es sich beim Carterschen Produkt um ein Artefakt handeln. Nach Wagners (22) Untersuchungen sind die Analysenwerte und das IR-Spektrum eher mit den Alternativformeln I oder II vereinbar:



Fettsäuren R: Stearinsäure

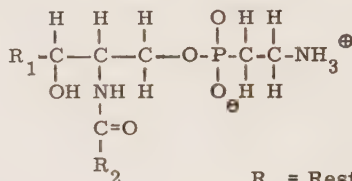
Palmitinsäure

Linolsäure

Linolensäure

Lignocerinsäure bzw. Cerebronsäure

Rouser (25) und Mitarbeiter fraktionierten die Phospholipide der See-Anemone zunächst auf einer Diäthylaminoäthyl-Cellulose-Säule, danach auf Kieselsäure- und Kieselsäure-Silikatsäulen. Neben klassischen Phosphatiden fanden sie ein neues Sphingolipid, welches sie Ceramidaminoäthylphosphonat nannten. Es besitzt eine freie Aminogruppe und eine direkte Kohlenstoff-Phosphorbindung.



R_1 = Rest der Kohlenstoffkette von Sphingosin oder Phytosphingosin

R_2 = Rest der Kohlenwasserstoffkette von Fettsäuren

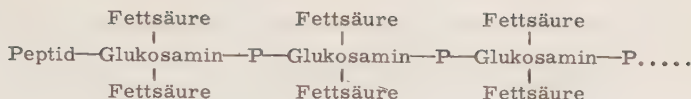
Ceramidaminoäthylphosphonat

Die Stellung der 2-Aminoäthylphosphonatgruppe an der primären Hydroxylgruppe ist analog zu anderen Sphingolipiden. Es liegt jedoch noch kein Beweis dafür vor, daß dies auch in dem neuen Sphingolipid der Fall ist.

2.1.4 Sonstige Phosphatide

Hier sei noch ein Phospholipid aus *Salmonella abortus equi* genannt. Nowotny und Mitarbeiter (26) entdeckten es. Nach Hydrolyse konnten Hexosamin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, α , ξ -Diaminopimelinsäure, Lysin, Alanin, Serin, Äthanolamin und Phosphorsäure nachgewiesen werden. An Fettsäuren waren alle geradzahlig, normalen, gesättigten von C_{10} bis C_{24} vorhanden (27).

Nowotny (28) schlug neuerdings folgende Struktur vor:



Glukosamin-P= 4-Phospho-glukosamin

Im Anschluß an die Besprechung dieser verschiedenen Phosphatide soll noch auf die Schwierigkeit ihrer Isolierung hingewiesen werden. Vielleicht ist ein großer Teil der gefundenen Verbindungen Artefakte (Spaltprodukte) aus größeren Molekülen oder von Komplexverbindungen mit anderen Substanzen, die während der Gewinnung, Reinigung und Aufarbeitung leicht spaltbar sind. Die Spaltprodukte können weiterhin mannigfachen Veränderungen unterliegen, z.B. der Hydrolyse, der Isomerisierung (Wanderung von Acyl-Resten) und der Oxydation durch Kontakt mit Adsorbentien.

2.2 Komplexbildung der Phospholipide

Phospholipide können mit Salzen, Ionen, Glykosiden, Alkaloiden, anderen Lipiden und Proteinen Komplexe bilden. Die beiden letzteren und die Ionenkomplexe sollen hier etwas näher behandelt werden, da ihnen im Stoffwechselgeschehen von Tier und Pflanze eine wichtige Rolle zukommt.

2.2.1 Kräfte, die die Komplexbildung bewirken (29)

Obwohl man die Struktur der verschiedenen Komplexe noch nicht genau kennt, so steht jedoch fest, daß Kovalenzen als Bindungsart, die die Molekülgruppen zusammenhalten, ausscheiden. Es handelt sich um labilere Bindungen wie:

2.2.1.1 van der Waal'sche Kräfte

Diese spielen eine Rolle in unpolaren Strukturen, sie sind schwach

und wirken deshalb nur über kurze Distanzen.

Beispiele: a) Aus dem Gebiet der Lipide

b) Aus dem Gebiet der Proteine

Unpolare Gruppen	Verbindungen, in denen sie anzutreffen sind
a) Gesättigte, gerade Kohlenwasserstoffketten	Gesättigte Fettsäuren und ihre Derivate
Gesättigte, verzweigte Kohlenwasserstoffketten	Iso- und Anteisosäuren
Kondensierte Kohlenwasserstoffringe	Cholesterin und Cholesterinester
b) Aliphatische, verzweigte Kohlenwasserstoffe	Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin

2.2.1.2 Dipol-Kräfte

Sie werden in polaren Strukturen wirksam.

Beispiele: a) Aus dem Gebiet der Lipide

b) Aus dem Gebiet der Proteine

Polare Gruppen	Verbindungen, in denen sie anzutreffen sind
a) Ester	Triglyzeride, Phosphoglyzeride
Äther	Inositide
Vinyläther	Fettäther
Carbinole	Plasmalogene
	Sphingomyeline, Mono- und Diglyzeride, Lysophosphoglyzeride, Cerebroside, Inositide
b) Hydroxyl-	Serin, Threonin, Tyrosin
Schwefelhaltige-	Cystein, Methionin
Iminosäuren	Prolin, Hydroxyprolin
Amide	Asparagin, Glutamin

2.2.1.3 Ionenbeziehungen

Sie treten überall da auf, wo geladene Strukturen vorhanden sind. Sie stellen die stärksten Bindungskräfte dar und sind über größere Distanzen wirksam.

- Beispiele: a) Aus dem Gebiet der Lipide
b) Aus dem Gebiet der Proteine

Geladene Gruppen	Verbindungen, in denen sie anzutreffen sind.
a) Primäre Phosphate	Phosphatidsäuren
Primäre Sulfate	Sulfatide
Sekundäre Phosphate	Phosphoglyceride, Sphingomyeline
Carboxyl-	Fettsäuren, Phosphatidylserin
Quarternäres Ammonium	Lezithine, Sphingomyeline
b) Carboxyl-	Asparaginsäure, Glutaminsäure
Imidazol-	Histidin
Ammonium-	Lysin, Hydroxylysin
Guanidin-	Arginin

2.2.2 Komplexbildung mit Ionen

Phosphatide werden oft Substanzen zugesetzt, die sich durch Autoxydation verändern können. Die Phosphatide sind in der Lage, Metallionen, welche die Autoxydation katalysieren, komplex zu binden und so an ihrer katalytischen Wirkung zu hindern.

Krog und Tolboe (30) isolierten aus Sojabohnen drei Phosphatidfraktionen, die verschieden stark mit Cu^{2+} Komplexe bildeten. Von Phosphatidylcholin wurden Cu^{2+} nur schwach gebunden, während Phosphatidyläthanolamin und Phosphoinositid starke Bindungskräfte ausübten. An Hand dieser Befunde diskutierten die Verfasser die Wirkung der drei Phosphatide als Synergisten bei der Autoxydation.

Von größter Bedeutung scheinen Phosphatide beim Ionentransport zwischen lebender Zelle und umgebendem Medium zu sein (31). In verschiedenen Theorien über den Ionentransport wird angenommen, daß die Kationen durch einen sogenannten "Träger", der in der Zellmembran vorhanden ist, transportiert werden. Als besonders aktive "Träger" können Phosphatidylserin und Diphosphoinositide fungieren, da sie Kationen wie Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} salzartig binden können (32/33).

Sphingomyeline und Lecithin binden keine Kationen in nennenswertem Ausmaß. Sie scheinen daher als "Träger" keine Rolle zu spielen.

Hoffman und Mitarbeiter (34) konnten in einem Modellversuch zeigen, daß auch Phosphatidyläthanolamin als "Träger" auftreten kann und zwar speziell für Na^+ . Hokin und Hokin (35) haben Beweise dafür erbracht, daß Phosphatidsäure am Na^+ -Transport beteiligt ist.

Phosphatide vermögen jedoch nicht nur Kationen zu transportieren, sondern auch Anionen, wie Hirt und Berchtold (36) in einem biophysikalischen Zellmodell zeigen konnten. In Tetrachlorkohlenstoff gelöstes Lecithin war in der Lage, Anionen aus wässriger Lösung in eine Lipid-Phase zu überführen, wenn in der wässrigen Phase zugleich gewisse Kationen vorhanden waren. Z. B. wurde der Transport von Tropäolin in die Lipid-Phase durch die Kationen Protamin und Polymyxin gefördert.

2.2.3 Komplexbildung mit anderen Lipiden

Ein Komplex aus Lecithin und Cholesterin ist schon lange bekannt (37). Genauer über das Zustandekommen desselben weiß man bis heute nicht. Price (38) zeigte, daß am Zusammenschluß weder die amphoteren Gruppen des Lecithins noch Gruppen, an denen Ionenanlagerung stattfinden kann, beteiligt sind. Er schloß daraus, daß es

sich um einen Adsorptionskomplex handeln müsse. Ebenso lange sind Gallensäure-Lezithinkomplexe bekannt (39).

Besonderes Interesse gilt den Komplexen der Phosphatide untereinander. Sie können zu größeren Aggregaten assoziieren und so Micellen bilden (29). Die einzelnen Phosphatidmoleküle dieser Aggregate besitzen polare oder geladene Gruppen, die im Molekül so angeordnet sind, daß sie auf Wassermoleküle oder andere polare Gruppen ausgerichtet sind, während ihr unpolarer Molekülanteil nach anderen unpolaren Substanzen orientiert sein kann. Sie können daher als Lösungs- oder Dispersionsvermittler zwischen zwei sich in einander nicht lösenden oder miteinander nicht mischbaren Medien auftreten, d.h. sie sind oberflächen- bzw. grenzflächenaktiv.

Die Verwendung von Lezithinen in pharmazeutischen Zubereitungen als Emulgatoren ist bekannt.

2.2.4 Komplexbildung mit Proteinen

Den Lipoproteinen haben in den letzten Jahren viele Forscher ihre Aufmerksamkeit geschenkt, da ihnen besondere Bedeutung bei fast allen biochemischen Prozessen zukommt. An der Bildung der Komplexe aus Protein und Lipid sind hauptsächlich die Phosphatide beteiligt.

Es gibt sehr verschiedene Lipoproteine. In den einen überwiegt der Lipidanteil, während die anderen zum größten Teil aus Protein bestehen. Bei der ersten Gruppe kann man sich die Bildung eines Komplexes nur durch das Nebeneinanderliegen einer vielfachen Lipidschicht mit einer wesentlich dünneren Eiweißschicht erklären (40). Zur zweiten Gruppe gehört z.B. das Albumin. Es ist nur an einigen wenigen Stellen seines Moleküls mit Lipid besetzt. Interessant ist, daß die Fettsäuren im Albumin durch van der Waal'sche Kräfte sehr fest gebunden sind. Sie kommen zwischen dem unpolaren Teil der

Fettsäuren und den unpolaren, paraffinartigen Außenteilen einer Alpha-Helix des Proteins zur Wirkung. (Je länger diese Kohlenwasserstoffketten beider sind, umso stärker ist die Bindung durch die obengenannten Kräfte.) Die Carboxylgruppen der Fettsäuren sind frei (40).

Über die Bindungsarten in vielen anderen Lipoproteinen herrscht noch Unklarheit. Wahrscheinlich kommen mehrere der oben aufgeführten Möglichkeiten in Betracht (siehe 2.2.1).

Am besten erforscht in Bezug auf Bindungsarten und Gestalt sind die klassischen α - und β -Lipoproteine des Plasmas. Es wird angenommen, daß diese kugelförmig gebaut sind (41). In der Schale liegt der Proteinanteil, auch Apolipoprotein genannt, der Phospholipide bindet. Letztere lagern weitere Lipide an (Triglyzeride, Cholesterinester und Cholesterin). Das fertige Lipoprotein besteht aus einer monomolekularen Proteinschale rund um einen Lipidkern. Die Phospholipide kann man als das die Lipid-Protein-Verbindung vermittelnde Agens ansehen, gewissermaßen als das Bindeglied zwischen beiden Komponenten. Die Haftung der Phosphatide am Eiweiß erklärt Zöllner (40) wieder durch van der Waal'sche Kräfte wie beim Albumin. Hier können sie zwischen den Acylresten der Phosphatide und den unpolaren Abschnitten der α -Helix auftreten. Elektrostatische Kräfte zwischen polaren Gruppen der beiden Komponenten werden verneint.

Viele Arbeiten der letzten Jahre beschäftigen sich mit der Zusammensetzung und Wirkung von Lipoproteinkomplexen:

Mc Indoe (42) isolierte aus dem Plasma legender Hennen einen Lipoproteinkomplex konstanter Zusammensetzung. Er bestand zu etwa 20% aus Eiweiß und zu 80% aus Lipiden. Von letzteren waren 25% Phospholipide und 4% meist freies Cholesterin, der Rest wahrscheinlich Triglyzeride.

Es ist möglich, daß dieser Phospholipoproteinkomplex den größten Teil der Plasmalipide und beinahe die Hälfte der Plasmaphosphoproteine, die im Eigelb sind, transportiert.

Lipide spielen wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung von bestimmten räumlichen Konfigurationen zwischen den verschiedenen Gliedern der Elektronentransportkette der Mitochondrien (43/44). Greenless und Wainio (45) und Hatefi (46) haben gezeigt, daß Phospholipide unentbehrlich für die Aktivität von Cytochrom c-Oxydase sind.

Reich und Wainio (47) konnten z.B. die enzymatische Aktivität einer Cytochrom c-Oxydase mit geringem Lipidgehalt wiederherstellen und die eines noch aktiven Präparats um mehrere hundert Prozent erhöhen, wenn sie ein gereinigtes Phospholipid zusetzten. Die Behandlung einer Cytochrom c und Phospholipid enthaltenden Lösung mit chemischen oder physikalischen Methoden, die natürliche Lipoproteine und insbesondere Cytochrom c-Phospholipidkomplexe zerstören, reduzierte die Cytochrom c-Oxydase-Aktivität.

In seinem jetzigen Stand von Reinheit enthält dieses Enzym etwa 15% Phospholipid und mag als Lipoprotein vorliegen (48). Vom Substrat, Cytochrom c, ist bekannt, daß es ebenfalls mit Phospholipiden verbunden ist (49). Wahrscheinlich existiert es in dem Elektronentransport-Partikel in einer lipidähnlichen Form, möglicherweise als ein Phospholipid-Cytochrom c-Komplex (50). - Einen solchen Komplex beschreiben Reich und Wainio. Er besteht zu etwa 15% aus Cytochrom c und 85% Äthanolamin-phosphatid. Das kleinste Molekulargewicht liegt bei 78 500. Das Häm - Eisenatom scheint nicht als Bindeglied zwischen Enzym und Phosphatid zu fungieren. Der Komplex ist löslich in Säuren, Alkalien und wässrigen Lösungen von gallensauren Salzen.

Fleischer, Klouwen und Brierley (51) berichten über die Lipid-Zusammensetzung von gereinigten Enzympräparaten aus Rinderherz-Mitochondrien. Sie teilen analytische Daten über die Lipid-Zusammensetzung von Rinderherz-Mitochondrien und submitochondrialen Partikeln mit, die in der Elektronen übertragende Kette eine Rolle spielen. Die aktivsten Elektronen übertragenden Untereinheiten, wie Cytochrom c-Oxydase, NAD - Cytochrom c-Reduktase, Bernsteinsäure-Cytochrom c-Reduktase und Bernsteinsäure-Coenzym Q-Reduktase, haben einen Lipidgehalt von 26 bis 27%, wie auch in Mitochondrien gefunden wurde. Die NAD-Diaphorase enthält 83% Lipide. Die Lipide in allen Partikeln sind vorwiegend Phospholipide. Lecithin, Phosphatidyläthanolamin, Cardiolipin und Phosphatidylinositol waren in der Phospholipid-Fraktion vorhanden. Die verschiedenen Segmente der Kette zeigten ein ähnliches, jedoch nicht identifiziertes Lipidmuster. Dieses könnte die wirklichen Unterschiede in der Lipid-Zusammensetzung entlang der Elektronen übertragenden Kette widerspiegeln und allein ein Ausdruck für die alternierende Zusammensetzung sein, die bisher noch nicht analysiert werden konnte.

Aus Schweineleber erhielten Tria und Barnabei (52) einen Lipoproteinkomplex, der Phosphor, Stickstoff, Zucker, Sphingosin, Cholin, Inosit und Cholesterin enthielt. Nach saurer Hydrolyse konnten zahlreiche Aminosäuren nachgewiesen werden. Der Peptidanteil betrug 12%, der Lipidanteil 88%. Das Lipoprotein hatte antithyreotoxische und lipotrope Eigenschaften. -

Mit diesen Beispielen über die Bildung, Zusammensetzung und physiologische Wirkungsweise der Lipoproteine soll die Einleitung abgeschlossen werden.

	Seite
3	<u>Allgemeiner Versuchsteil</u> 26
3.1	Isolierung von Phospholipid aus Wollfett 26
3.2	Eigenschaften von Phospho-inosito-glyzero-lipid I und Phospho-inosito-glyzero-lipid II 27
3.2.1	Untersuchung der Substanzen auf Einheitlichkeit 27
3.2.2	Behandlung von Ph I und Ph II mit Wasser 29
3.2.3	Behandlung von Ph I und Ph II mit Methanol 30
3.2.4	Schmelzpunkte von Ph I und Ph II 30
3.2.5	Löslichkeit von Ph I und Ph II 30
3.2.6	Drehung von Ph I und Ph II 31
3.2.7	IR-Spektren von Ph I und Ph II 31
3.2.8	Bestimmung der Molekulargewichte 34
3.2.8.1	Molekulargewichtsbestimmung mit der Ultrazentrifuge 34
3.2.8.2	Molekulargewichtsbestimmung mit dem Dampfdruck-osmometer 41
3.3	Untersuchungen an Ph I und Ph II 45
3.3.1	Stickstoff- und Phosphorwerte der beiden Substanzen 45
3.3.2	Quantitative Bestimmung des wasser- und fettlöslichen Anteils nach saurer Hydrolyse 45
3.3.3	Hydrophile Spaltprodukte von Ph I und Ph II 46
3.3.3.1	Phosphorsäure und deren Ester 46
3.3.3.2	Inosit 47
3.3.3.3	Glyzerin 49
3.3.3.4	Aminosäuren 50
3.3.4	Untersuchungen an den Peptidbestandteilen von Ph I und Ph II 54
3.3.4.1	Bestimmung der endständigen Aminosäure nach Sanger 54
3.3.4.2	Bestimmung der C-terminalen Aminosäure nach Akabori 57
3.3.5	Lipophile Spaltprodukte von Ph I und Ph II 62
3.3.5.1	Cholesterin 62
3.3.5.2	Fettsäuren 64
3.4	Molekülaufbau 70
3.5	Diskussion 78

3

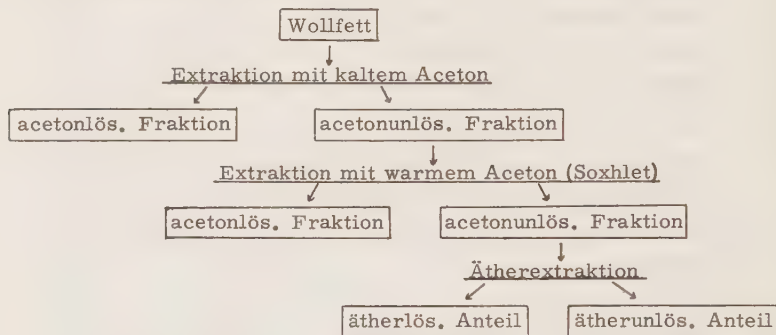
Allgemeiner Versuchsteil

3.1

Isolierung von Phospholipid aus Wollfett

Da angestrebt wurde, möglichst wieder die gleiche Substanz zu gewinnen, die schon Fülberth (2) erhalten hatte, kam die von ihm ausgearbeitete Isolierungsmethode zur Anwendung.

Sie sei nochmals kurz skizziert:



Zwei Wollfettssorten standen zur Verfügung, eine englische (Centrifuged neutral grease) und eine italienische (Italian neutral wool grease). Sie stammten von der Westbrook Lanolin Company, Bradford in England. ^{x)}

Phosphorwerte der beiden Ausgangsprodukte

Sorte	mg P_2O_5	mg P
	in 100 g	
Englisches Wollfett (Centrifuged neutral grease)	5,9	2,6
Italienisches Wollfett (Italian neutral wool grease)	8,2	3,6

^{x)} Wir danken auch an dieser Stelle der Westbrook Lanolin Company (Bradford 4, England) für die bereitwillige Überlassung dieser Wollfettssorten.

Abweichend von der Fülberth'schen Isolierungsmethode wurde bei dem italienischen Wollfett eine noch schonendere Behandlung während der Soxhletextraktion angestrebt. Das in Kieselgel feinverteilte Wollfett wurde zuerst in einer Soxhletapparatur mit kaltem Aceton behandelt (s. Experimenteller Teil 4. 1). Daran schloß sich noch eine kurze Extraktion mit warmem Aceton an.

Der ätherlösliche Anteil (s. obiges Schema) wurde ebenfalls auf einer Kieselgelsäule stufenweise mit Aceton, Chloroform und Methanol eluiert, sodaß wie bei Fülberth (2) je eine

Chloroform-Fraktion,

Methanol-Fraktion

und ätherunlösliche Fraktion

entstanden.

Die Untersuchungen dieser Arbeit galten jeweils den Chloroform-Fractionen des englischen und italienischen Wollfettes. Von beiden standen 2,5 bzw. 3,0 g zur Verfügung, die aus 2 bzw. 3 kg Wollfett isoliert wurden. Erstere wurde als Phospho-inosito-glyzero-lipid I, letztere als Phospho-inosito-glyzero-lipid II (im folgenden mit Ph I und Ph II abgekürzt) bezeichnet.

3.2 Eigenschaften von Phospho-inosito-glyzero-lipid I und Phospho-inosito-glyzero-lipid II

Beide waren hellbraune, trockene Pulver.

3.2.1 Untersuchung der Substanzen auf Einheitlichkeit

Dazu wurden Ph I und Ph II untersucht. Es kamen ammoniumsulfathaltige Kieselgel G-Platten zur Anwendung (53). Die Deaktivierung der Schichten war erforderlich, da polare Lipide, zu denen die Phospholipide zählen, auf aktiven Schichten zur Schwanzbildung neigen. Statt Ammoniumsulfat kann man nach Skipski, Peterson

und Barclay (54) auch etwas Natriumacetat oder Natriumcarbonat dem Kieselgel G zusetzen. Chalvardjian (55) arbeitet mit "nassen" Kieselgel G-Schichten. Durch diese verschiedenen Möglichkeiten der Deaktivierung geht die meist bei Kieselgel G vorliegende Adsorptionschromatographie in Verteilungschromatographie über.

Abbildung 1

1. Dünnschichtchromatogramm von
Ph I und Ph II

- 1: Ph I
2: Ph II
3: Cholesterin

Kieselgel G (Merck)

Fließmittel (56): Chloroform 60 ml
Methanol 35 ml
Wasser 8 ml

Sprühreagenz : Antimon (3)-Chlorid-
Lösung

Farbe : Ph I und Ph II grau-braun
Cholesterin violett

Ph I und Ph II waren außerdem mit
Ammoniummolybdatlösung blau anfärb-
bar (Nachweis von Phosphorsäure).



Daraus, daß Ph I und Ph II jeweils als ein Fleck wanderten, konnte geschlossen werden, daß einheitliche Substanzen vorlagen. Auch die Anwendung anderer Fließmittel unter sonst gleichen Bedingungen brachte kein anderes Ergebnis (z. B. s. Abbildung 2). Hier wanderte nur Cholesterin während Ph I und Ph II fest am Startpunkt verblieben.



Abbildung 2

2. Dünnschichtchromatogramm von
Ph I und Ph II

1: Ph I

2:

3: Ph II

4: Cholesterin

Fließmittel:	n-Propanol	50 ml
	Essigester	10 ml
	Wasser	30 ml
	Ammoniak 25%ig	10 ml

3.2.2 Behandlung von Ph I und Ph II mit Wasser

Bei der Überprüfung von Lipoproteinen auf Einheitlichkeit hat es sich bewährt, die Substanz mit Wasser zu schütteln und längere Zeit stehen zu lassen. Dadurch kann eine Abtrennung von locker gebundenen, hydrophilen Bestandteilen erreicht werden. Da dies eine weitere Möglichkeit zu sein schien, die Einheitlichkeit von Ph I und Ph II zu überprüfen, kam dieses Verfahren bei beiden Substanzen zur Anwendung.

Sie wurden mit Wasser von Raumtemperatur geschüttelt und über Nacht stehengelassen. Danach wurde filtriert und auf wasserlösliche Bestandteile untersucht. Vom eingedampften wässrigen Filtrat wurden Proben auf Filtrierpapier aufgetragen, angetrocknet und mit Ninhydrin-, Ammoniummolybdat- und Silbernitratlösung als

Reagenzien auf Aminosäuren, Phosphorsäure und Inosit besprüht. In keinem Fall war eine positive Reaktion zu beobachten.

3.2.3 Behandlung von Ph I und Ph II mit Methanol

Zur Aufspaltung von Symplexbindungen, die Phosphatide in natürlichem Material leicht bilden, wird häufig Methanol als wirksames Mittel eingesetzt. Die Einwirkung dieses Alkohols auf Ph I und Ph II sollte nochmals einen Beitrag zur Lösung der Frage der Einheitlichkeit beider Phosphatide liefern.

Die Substanzen wurden jeweils 2 1/2 Stunden lang im Mikrosoxhlet siedendem Methanol ausgesetzt. Nach Filtration und Einengen wurde der Alkohol dc auf lipophile Spaltprodukte untersucht. Es waren jedoch weder Fettsäuren noch Cholesterin nachzuweisen. Die Prüfung auf hydrophile Bestandteile (ausgeführt im Kapitel 3.2.2) verlief ebenfalls negativ.

Nach diesen Ergebnissen und den chromatographischen Versuchen kann angenommen werden, daß Ph I und Ph II Verbindungen sind, deren Bausteine durch Kovalenzen zusammengehalten werden.

3.2.4 Schmelzpunkte von Ph I und Ph II

Genaue Schmelzpunkte können nicht angegeben werden, da beide Phosphatide bei 180° C unter Rotbraunfärbung anfangen zu sintern, ohne flüssig zu werden. Beide verbleiben als zähe, harzige Masse.

3.2.5 Löslichkeit

Beide Substanzen waren in Chloroform, Toluol und Benzol gut, in Äther weniger gut löslich, in Wasser und Aceton unlöslich.

3.2.6 Drehung

Ph I und Ph II waren optisch inaktiv.

3.2.7 IR - Spektren

Zum qualitativen Nachweis bestimmter Gruppen von Ph I und Ph II wurde die IR - Spektroskopie angewandt (s. Abb. 3). Es sollte vor allem festgestellt werden, ob Übereinstimmung zwischen beiden Substanzen und auch mit dem von Fülberth(2) isolierten Phosphatid (dort Chloroform-Fraktion I genannt) besteht.

Die spektrale Lage der charakteristischen Absorptionsbanden wird tabellarisch wiedergegeben.

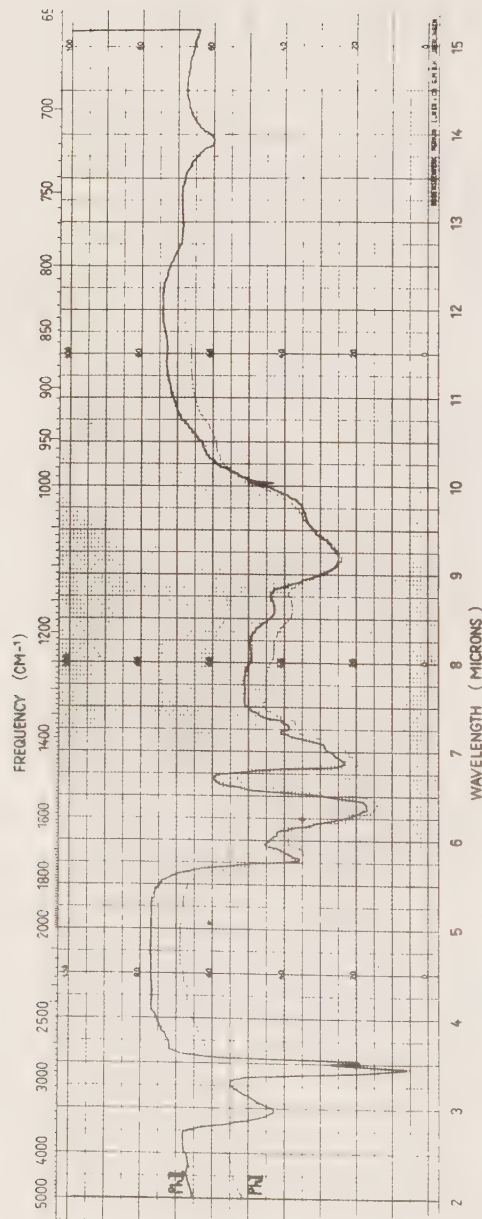


Abbildung 3

Infrarotspektrum von Ph I und Ph II
 KBr-Methode (5 mg Substanz auf 1 g KBr)
 Apparat: Perkin-Elmer-Spektrometer mit NaCl-Prisma

Charakteristische Absorptionsbanden von Ph I und Ph II

Wellenlängenbereich	Wellenzahlbereich cm^{-1}	Gruppe
2,98	3350	OH, NH
3,45 u. 3,53	2900 u. 2830	CH Doppelbande
5,78	1730	C=O (Ester)
6,40	1562	COO^-
6,87	1455	CH_2
7,27	1375	CH_3
9,76	1025	P-O-Alkyl
13,93	717	$(\text{CH}_2)_x$

Aus den IR-Spektren von Ph I und Ph II geht hervor, daß beide Substanzen fast gänzlich übereinstimmen und auch dem Fülberth'schen (2) Phosphatid (Chloroform Fraktion I genannt) recht ähnlich sind. -

Auf die folgenden Banden sei besonders hingewiesen:

- 1.) Die Carbonylbande bei 1730 cm^{-1} , die auch bei Lezithin zu finden ist, zeigt einen Ester an.
- 2.) Die Absorption bei 1025 cm^{-1} deutet auf Phosphorsäureester hin.
- 3.) Die Absorption bei 717 cm^{-1} läßt längere Kohlenwasserstoffketten erkennen (z. B. Fettsäuren oder die aliphatische Seitenkette von Cholesterin bei Ph II).

3.2.8 Bestimmung der Molekulargewichte

Um die quantitative Zusammensetzung von Ph I und Ph II zu ermitteln, war es erforderlich, die Molekulargewichte beider zu bestimmen. Durch ihre Kenntnis konnte überprüft werden, ob die gefundenen Mengen der Einzelbestandteile in das Gewicht des Gesamtmoleküls hineinpaßten.

3.2.8.1 Molekulargewichtsbestimmung mit der Ultrazentrifuge (57, 58 59, 60, 61, 62) x)

Zunächst soll kurz der Aufbau der Zentrifuge beschrieben werden (63/64). Sie besteht aus einer Vakuumkammer (Hochvakuum ca. 1 μ Torr), in der ein an einer dünnen Achse aufgehängter Rotor läuft. Die Achse führt durch den Deckel der Kammer hindurch und wird außen von einer Turbine oder einem Elektromotor angetrieben. Der Rotor ist mit zwei gegenüberliegenden Bohrungen versehen, die eine Meßzelle und eine dem Gewichtsausgleich dienende Balancezelle aufnehmen. Die zylindrische Meßzelle hat einen sektorförmigen Ausschnitt, der die zu untersuchende Lösung aufnimmt. Die Zelle ist oben und unten durch je eine Bergkristallscheibe verschlossen. Durch diese Scheiben und durch Kollimatorlinsen in der Vakuumkammer läßt sich der Sedimentationsvorgang optisch (photographisch) verfolgen.

x)

Auch an dieser Stelle sei Herrn Privatdozent Dr. R. Jaenicke vom Institut für Kolloidchemie und Physikalische Biochemie der Universität Frankfurt am Main für die Ausführung der Bestimmung gedankt.

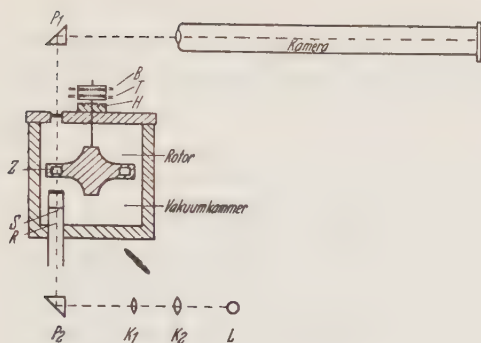


Abbildung 4

Schematischer Aufbau einer luftgetriebenen Ultrazentrifuge

L: Quecksilberhöchstdrucklampe

K_1 , K_2 : Kondensorlinsen

P_1 , P_2 : Umlenkprismen

S: Skala, die in dem Rohr R verschiebbar ist

Z: Zelle zur Aufnahme der Lösung

H: Hubluftdüsen

T: Treibluftdüsen

B: Bremsluftdüsen

Die Ultrazentrifugation (65/66) dient der Bestimmung der Größe und Gestalt von Kolloiden und Makromolekülen in Lösung. Ihr Anwendungsbereich erstreckt sich heute von Partikelgewichten von wenigen Hundert (z. B. Oligopeptide, Zucker) bis zu einigen hundert Millionen (Viren) und darüber hinaus bis in das Gebiet grobdispenser Verteilungen (67). Die Lösung von im allgemeinen niedriger Konzen-

tration wird der Zentrifugalbeschleunigung $\omega^2 \cdot r$ ausgesetzt (ω = Winkelgeschwindigkeit = $2 \cdot \pi \cdot \nu$, ν = Umdrehungen/Sekunde, r = Abstand von der Rotationsachse). Durch die Zentrifugalkraft $m \omega^2 \cdot r$ (m = Masse einer Molekel) werden die einzelnen gelösten Molekeln je nach ihrer Größe und Form verschieden schnell zum Zellenboden sedimentiert.

Diese verschiedene Schnelligkeit der Teilchen wird verfolgt (photographisch, s. oben!). Wäre keine Diffusion (sie wirkt der Sedimentation entgegen) vorhanden, und hätten alle Teilchen das gleiche Molekulargewicht, so würde sich eine scharfe Trennfläche zwischen dem Lösungsmittel, aus dem bereits alle Teilchen heraus sedimentiert sind, und der angereicherten Lösung ausbilden. Die Geschwindigkeit, mit der sich diese Trennfläche bewegt, liefert die Sedimentationskonstante. Es tritt jedoch immer Diffusion auf. Hinzu kommt der die Schärfe der "Trennfläche" vermindernde Effekt bei Vorliegen einer polymolekularen Substanz, deren verschiedene Komponenten unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit besitzen. Daher wird die Bewegung der durch den Diffusionsprozeß und Polymolekularität verbreiterten Sedimentationszone verfolgt. Die Diffusionsgeschwindigkeit ist bei niedrigen Molekulargewichten so groß, daß die Sedimentationskurve abflacht, bevor sich ein Gipfel ausgebildet hat. Durch den Umstand, daß sich der Gipfel der Sedimentationskurve nicht schnell genug vom Meniskus in der Zelle löst, war bisher die untere Grenze für Molekulargewichtsbestimmungen (bis etwa $MG = 10^4$) in der Geschwindigkeitsultrazentrifuge gegeben. Der Meßbereich konnte jedoch durch Zellen, in denen die Möglichkeit des Überschichtens besteht, bis herunter zur Sedimentationskonstanten des Rohrzuckers ($MG = 342$) erweitert werden. Dabei werden zu Beginn des Ultrazentrifugenlaufes Lösung und Lösungsmittel derart überschichtet, daß sich eine Grenzfläche zwischen beiden etwa in der Mitte der Zelle ausbildet. So ist es mög-

lich, alle am Meniskus auftretenden Störungen zu vermeiden.

Für niedrige Molekulargewichte ist weiterhin die von Archibald angegebene Methode geeignet (68), die in dieser Arbeit zur Anwendung kam.

Die Sedimentationskraft $k_{\sigma} = MG(1 - V_p \rho) \omega^2 \cdot x$

(V_p : partielles spezifisches Volumen, ρ : Dichte der Lösung bzw. des Lösungsmittels, $\omega = 2\pi \nu$: Winkelgeschwindigkeit), die im Radialabstand x vom Rotationszentrum auf 1 Mol einer Substanz ausgeübt wird, ist im stationären Zustand konstanter Sedimentationsgeschwindigkeit $\frac{dx}{dt}$ der Reibungskraft

$$k_{\rho} = f s \frac{dx}{dt}$$

$$\text{identisch} \quad f s \frac{dx}{dt} = MG(1 - V_p \rho) \omega^2 x$$

Da nach Einstein für die freie Diffusion in verdünnter Lösung zugleich

$$f_D = \frac{RT}{D}$$

($R = 8,315 \cdot 10^7$ erg.grad $^{-1}$.mol $^{-1}$, allgem. Gaskonstante,

T : absolute Temperatur, D : Diffusionskonstante) gilt, folgt unter der Annahme $f_s = f_D$ und nach Definition der Größe

$$s \equiv \frac{\frac{dx}{dt}}{\omega^2 \cdot x}$$

"Sedimentationskonstante" (Dimension: sec, Einheit 1 S (Svedberg) = 10^{-13} sec):

$$MG = \frac{RT}{D(1 - V_p \rho) \omega^2 \cdot x} \cdot \frac{dx}{dt} = \frac{RT}{D(1 - V_p \rho)} s$$

Das Molekulargewicht MG folgt demnach aus den Parametern s , D , V_p , ρ und T . s ist auf Grund der Konzentrationsabhängigkeit von ρ

und f_s selbst eine Funktion der Konzentration. Das gleiche gilt in geringerem Ausmaß auch für D , während V_p unabhängig von c_p ist. Für exakte Messungen muß daher auf $c_p \rightarrow 0$ extrapoliert werden und

$$MG = \frac{RT}{(1 - V_p \rho)} \cdot \frac{s_0}{D_0}$$

ermittelt werden.

Für niedrige Molekulargewichte eignet sich die von Archibald angegebene Methode der "Annäherung an das Sedimentationsgleichgewicht".

Hier wird aus der Anreicherung der Substanz am Boden (künstliche Grenzschicht durch Unterschichtung mit spezifisch schwerem Lösungsmittel) bzw. der entsprechenden Verarmung der Meniskuszone das Gewichtsmittel des Molekulargewichts berechnet. Es gilt für monodisperse Systeme die Beziehung:

$$MG = \frac{RT}{(1 - V_p \rho)} \omega^2 \cdot \frac{\left(\frac{dc}{dx}\right)_m}{c_m x_m} = \frac{RT}{(1 - V_p \rho)} \omega^2 \cdot \frac{\left(\frac{dc}{dx}\right)_b}{c_b x_b} = \frac{RT}{(1 - V_p \rho)} \omega^2 \cdot \delta$$

wobei $\left(\frac{dc}{dx}\right)_m$ bzw. $\left(\frac{dc}{dx}\right)_b$ den Konzentrationsgradienten an Meniskus bzw. Boden darstellen, c_m und c_b die Konzentration an Meniskus und Boden und schließlich x_m und x_b die entsprechenden Radialabstände. $\frac{dc}{dx}$ und x folgen aus den Photogrammen des Experiments, c_m bzw. c_b folgen nach Klawiner und Kegeles (69) aus einem Überschichtungsversuch unter identischen Versuchsbedingungen.

Für den Fall paucidisperser oder polydisperser Systeme ergibt sich der Parameter δ in obiger Gleichung für Meniskus und Boden als verschieden, sodaß hier unmittelbar ein qualitatives Kriterium der Monodispersität gegeben ist.

Beide hier kurz diskutierten Methoden haben die Bestimmung des

partiellen spezifischen Volumens zur Voraussetzung, die pyknometrisch vorgenommen wurde.

Messungen und Ausrechnungen von Ph II

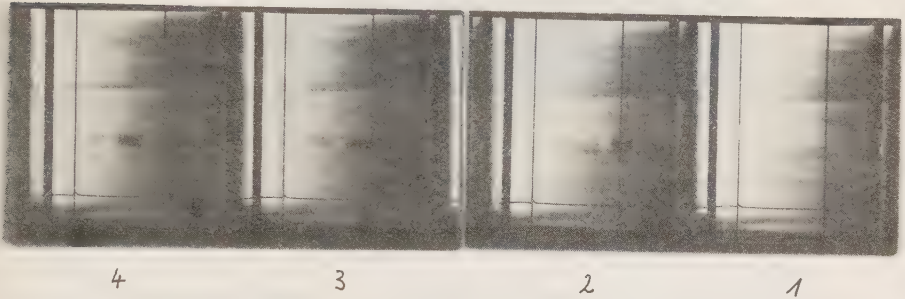


Abbildung 5

1. - 4. Aufnahme: Archibald-Versuch (68), Unterschichtung mit gesättigter KCl-Lösung. 12 590 UpM

- | | | |
|-----------------|---------------------------------------|----------------|
| 1. Aufnahme 18' | nach Erreichen der Endgeschwindigkeit | } Intervall 8' |
| 2. Aufnahme 26' | " | |
| 3. Aufnahme 34' | " | |
| 4. Aufnahme 42' | " | |

Philpot-Winkel 80° ,

$T = 20,00 \pm 0,05^{\circ} \text{ C}$

Normalzelle, Schichtdicke 12 mm, Auswertung aus 20-fachen Vergrößerungen.

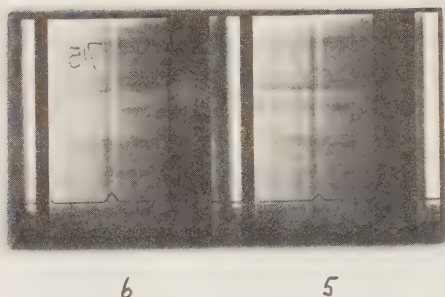


Abbildung 6

5. und 6. Aufnahme: Überschichtungsversuch, 44 770 UpM.

Überschichtung mit Außenflüssigkeit der Gleichgewichtsdialyse
in Überschichtungszelle Kel-F, Kapillartyp, Schichtdicke 12 mm.

5. Aufnahme 6' nach Überschichtung, Philpotwinkel 80°

6. Aufnahme 8' nach Überschichtung, Philpotwinkel 70°

Konzentrationsbestimmung aus der Fläche in 20-facher Ver -
größerung.

Ergebnis:

1. Bestimmung des partiellen spezifischen Volumens (V_p)

Dichte des Lösungsmittels $\varrho_{Lm} = 0,8669_4 \text{ g cm}^{-3}$

Dichte der Lösung: $\varrho_{Lsg} = 0,86977_9 \text{ g cm}^{-3}$

Konzentration an Ph II: $c = 12,40_9 \text{ mg/ml}$ (gravimetrisch)

daraus folgt für V_p :

$$V_p = 0,882 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$$

2. Berechnung des Molekulargewichts aus der Ultrazentrifugierung

$$MG = \frac{RT}{(1 - v_p \rho_{Lm}) \omega^2} \cdot \delta = f_\delta \cdot \delta$$

$$\delta_{\text{Meniskus}} = 1,36^{+0,21}$$

$$\delta_{\text{Boden}} = 2,02^{+0,30}$$

$$f_\delta = 5,953 \cdot 10^4$$

daraus folgt für das Gewichtsmittel:

$$MG_{\text{Ph II}} \text{ aus der Berechnung am Meniskus} = 8\,100^{+1\,100}$$

$$MG_{\text{Ph II}} \text{ aus der Berechnung am Zellboden} = 12\,000^{+1\,800}$$

3.2.8.2 Molekulargewichtsbestimmung mit dem Dampfdruckosmometer

Da das Ergebnis der Ultrazentrifuge anzeigte, daß das Molekulargewicht von Ph II um 10 000 lag, wurde eine andere Bestimmungsmethode gesucht, da sich die Ultrazentrifuge besser zur Bestimmung von Molekulargewichten eignet, die weit über 10 000 liegen.

Als geeignetes Gerät bot sich das Dampfdruckosmometer an. Es wurde mit einem Mechrolab - Vapor Pressure - Osmometer, Modell 301A, gearbeitet.

Zunächst soll kurz das Arbeitsprinzip dieses Gerätes erläutert werden. - Genauer über die Theorie des thermoelektrischen Osmometertyps ist bei Brady und Mitarbeiter (70) zu finden.

Eine Lösung hat stets einen niedrigeren Dampfdruck als das reine Lösungsmittel, da die Lösung durch den gelösten Stoff in Bezug auf das Lösungsmittel verdünnt ist. In diesem Osmometer wird nun je ein Tropfen Lösung und Lösungsmittel nebeneinander in einer mit Lösungsmitteldampf gesättigten Kammer aufgetragen. Auf dem Lösungstropfen wird auf Grund seines geringeren Dampfdruckes

eine stärkere Kondensation als auf dem Lösungsmitteltropfen stattfinden, d. h. es wird auf ersterem mehr Verdampfungswärme freigesetzt als auf letzterem, sodaß zwischen beiden Tropfen eine Temperaturdifferenz auftritt. Diese ist proportional der Dampfdruckerniedrigung und damit der Konzentration des gelösten Stoffes. Der beschriebene Effekt ist allein von der Anzahl der gelösten Moleküle abhängig nicht von deren chemischen Eigenschaften. Das Instrument kann daher mit einer Konzentrationsreihe eines bekannten Stoffes geeicht werden. Die Molarität eines unbekannten Stoffes in dem gleichen Lösungsmittel kann direkt von der Eichkurve abgelesen werden.

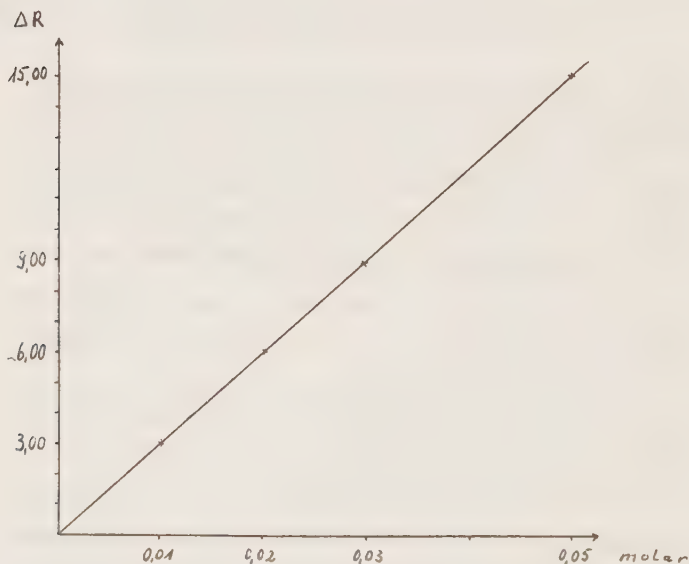


Abbildung 7

Eichkurve zum Dampfdruckosmometer "Mechrolab", aufgestellt mit 0,01; 0,02; 0,03 und 0,05 molaren Lösungen von Benzoin in Toluol

Die am Gerät abgelesenen Werte für ΔR (Maß für die jeweilige Temperaturdifferenz zwischen Lösungs- und Lösungsmitteltropfen) wurden durch die dazu gehörigen molaren Konzentrationen $[M]$ geteilt und die Quotienten $\frac{\Delta R}{[M]}$ gegen $[M]$ aufgetragen und auf die Konzentration $\rightarrow 0$ extrapoliert. Dabei erhielt man den Eichfaktor K .

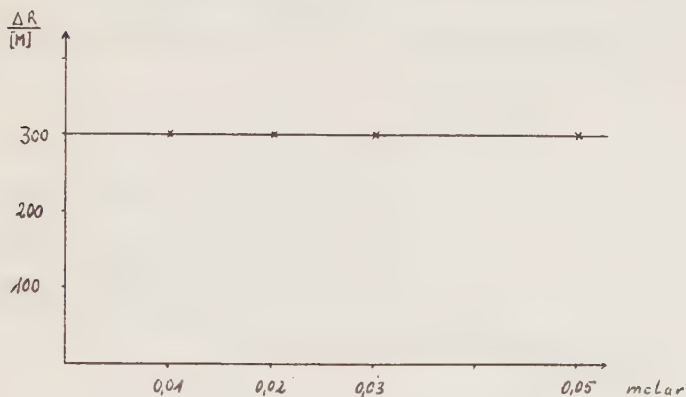


Abbildung 8

Graphische Ermittlung des Eichfaktors K

$$K = 300$$

Zur Bestimmung der Molekulargewichte von Ph I und Ph II wurde in der beschriebenen Weise vorgegangen. Für verschieden stark konzentrierte Lösungen von Ph I bzw. Ph II in Toluol wurden die ΔR -Werte bestimmt.

Ph I:

	Mittelwerte	
1.) 50,0 mg in 5 ml Toluol (=10,0 g/Liter) $\Delta R = 0,620$	$+0,024 \frac{\Delta R}{C} = 0,0620$	} $+0,0027$
2.) 70,2 mg in 5 ml Toluol (=14,1 g/Liter) $\Delta R = 0,891$	$+0,026 \frac{\Delta R}{C} = 0,0632$	
3.) 83,7 mg in 5 ml Toluol (=16,7 g/Liter) $\Delta R = 1,068$	$+0,030 \frac{\Delta R}{C} = 0,0639$	

durchschnittliche Abweichung der ΔR -Werte der
drei Konzentrationen: 0,027

Ph II:

	Mittelwerte	
1.) 30,0 mg in 5 ml Toluol (= 6,0 g/Liter) $\Delta R = 0,256$	$+0,017 \frac{\Delta R}{C} = 0,0426$	} $+0,0019$
2.) 51,0 mg in 5 ml Toluol (=10,2 g/Liter) $\Delta R = 0,438$	$+0,018 \frac{\Delta R}{C} = 0,0429$	
3.) 74,1 mg in 5 ml Toluol (=14,8 g/Liter) $\Delta R = 0,640$	$+0,022 \frac{\Delta R}{C} = 0,0432$	

durchschnittliche Abweichung der ΔR -Werte der
drei Konzentrationen: 0,019

Die ΔR -Werte wurden in diesem Fall durch die jeweils dazugehörige Konzentration C ($C = \text{g/Liter}$) geteilt, die erhaltenen Quotienten gegen die Konzentration aufgetragen und ebenfalls auf die Konzentration $\rightarrow 0$ extrapoliert. Es ergaben sich so die Werte 0,0595 bzw. 0,0422 für die beiden Substanzen Ph I und Ph II.

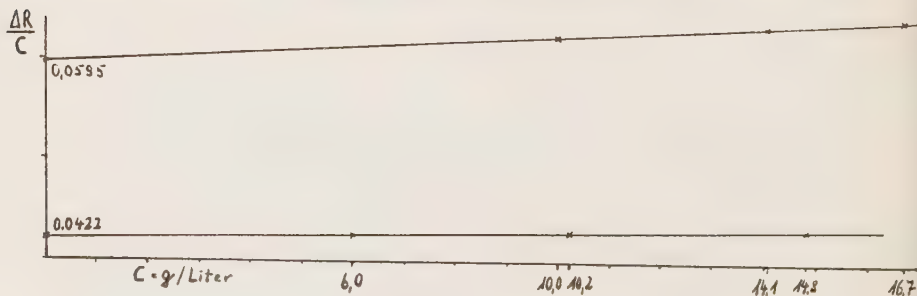


Abbildung 9

Die Molekulargewichte wurden nun folgendermaßen errechnet:

$$\text{Ph I: } \text{MG} = \frac{K}{0,0595} = \frac{300}{0,0595} = 5050 \pm 225$$

$$\text{Ph II: } \text{MG} = \frac{K}{0,0422} = \frac{300}{0,0422} = 7120 \pm 325$$

3.3 Untersuchungen an Ph I und Ph II

3.3.1 Stickstoff- und Phosphorwerte der beiden Substanzen

	% N	% P ₂ O ₅	% P
Ph I	2,1	2,70	1,18
Ph II	3,5	3,09	1,35

Ph I: 1,18% P = 59,6 g P in 5050 g Ph I. Das sind 2 Mol Phosphor bzw. Phosphorsäure.

Ph II: 1,35% P = 96,0 g P in 7120 g Ph II. Das sind 3 Mol Phosphor bzw. Phosphorsäure.

Die Stickstoffbestimmungen erfolgten nach Kjeldahl (71).

Die Phosphorwerte wurden nach der Halbmikromethode von Becker und Krull (72) ermittelt.

3.3.2 Quantitative Bestimmung des wasser- und fettlöslichen Anteils nach saurer Hydrolyse

Um einen ersten Einblick in die Zusammensetzung von Ph I und Ph II zu erhalten, wurde jeweils nach hydrolytischer Spaltung der verbleibende Fettanteil bestimmt. Es zeigte sich, daß beide Phosphatide überwiegend aus lipophilen Bestandteilen aufgebaut sind.

Nach salz- und schwefelsaurer Hydrolyse (s. 3.3.2.4 und 3.3.3.2) kam jeweils der ausgeätherte bzw. abfiltrierte Fettrückstand zur Auswaage.

Von 3,50 mg Ph I verblieben als lipophiler Anteil: 2,63 mg = 75% (=25% hydrophiler Anteil)

Von 3,61 mg Ph II verblieben als lipophiler Anteil: 2,28 mg = 63% (=37% hydrophiler Anteil)

Nach diesem orientierenden Überblick über die Zusammensetzung beider Substanzen sollen nun zuerst die hydrophilen Spaltprodukte besprochen werden.

3.3.3 Hydrophile Spaltprodukte von Ph I und Ph II

3.3.3.1 Phosphorsäure und deren Ester

Nach saurer Hydrolyse (4 n HCl, 110° C, 1 Stunde), Abfiltrieren der Fettbestandteile und Entfernen der Salzsäure im Vakuumexsikator über KOH konnten Phosphorsäure, Inosit-mono- und Inosit-di-phosphorsäure nachgewiesen werden. Dazu wurde eine pc - Methode von Schormüller und Würdig (73) benutzt. Es handelt sich dabei um ein Verfahren, welches es gestattet, verschiedene Inositphosphorsäuren (Inosit-mono-, -di-, -tri-, -tetra-, -penta- und -hexaphosphorsäure) auf Rundfilterpapier horizontal mit einer Lösung von Trichloressigsäure in Aceton, der eine Spur von Titriplex III (Merck) zugesetzt ist, aufzutrennen.

Abbildung 10



Rundfilterchromatogramm zur Identifizierung der Phosphorsäure und ihrer Inositester

- 1: Hydrolysat von Ph I
- 2: Inosit-mono-phosphorsäure (IMP)
- 3: Inosit-di-phosphorsäure (IDP)
- 4: o-Phosphorsäure

Fließmittel: Aceton 75 ml
0,1 m Titriplex III
(Merck) 1 ml
Trichloressigsäure 25%ig 25 ml

Aus dem Chromatogramm geht hervor, daß das Hydrolysat von Ph I IDP, IMP und o-Phosphorsäure enthält.

Die Sichtbarmachung erfolgte durch Besprühen mit Ammonium-molybdat-Lösung und anschließende UV-Bestrahlung.

Farbe: IDP }	blau
IMP }	
Phosphorsäure grünblau	

Ein entsprechendes Chromatogramm von Ph II zeigte ebenfalls Inositmono-, Inositdiphosphat und Phosphorsäure.

3.3.3.2 Inosit selbst ließ sich nach Hydrolyse von Ph I und Ph II mit 2 n H_2SO_4 nachweisen. In gleicher Weise gelang der Nachweis, wenn beide Substanzen mit 60%iger HJ bei 120° C behandelt wurden (s. Glyzerinnachweis). Nach Neutralisation (Ionenaustauscher) der H_2SO_4 bzw. Abziehen der HJ im Vakuumexsikkator (über KOH) wurde der wässrige Hydrolysenanteil pc und dc untersucht. Nach Behandeln mit Silbernitratlösung tauchten in beiden Fällen braune Flecke auf, deren Rf-Werte mit dem der Vergleichssubstanz Inosit (Merck) übereinstimmten.



Abbildung 11

Papierchromatogramm zur Identifizierung von Inosit

1: Inosit (Merck)

2: Ph I	} mit 2 n H_2SO_4 hydrolysiert
3: Ph II	

Methode : absteigend

Laufzeit : 24 Std
(Durchlaufchromatogramm)

Sprühreagenz: Silbernitratlösung

Fließmittel :	Butanol	40 ml
	Eisessig	10 ml
	Wasser	10 ml

Abbildung 12



Dünnschichtchromatogramm zur Identifizierung von Inosit

1: Ph I }
2: Ph II } mit 60%iger HJ behandelt

3: Inosit (Merck)

Kieselgel G

Sprühreagenz: Silbernitratlösung

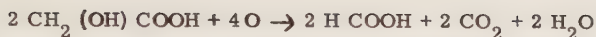
Fließmittel :	n-Propanol	50 ml
	Essigsäureäthylester	10 ml
	Wasser	30 ml
	Ammoniak 10%ig	10 ml

An den qualitativen Inositnachweis schloß sich eine quantitative Bestimmung an. Sie erfolgte nach Böhm und Richarz (74). Ph I und Ph II wurden wiederum mit 2 n H₂SO₄ hydrolysiert. Im Anschluß an die Neutralisation (Ionenaustauscher) des wässrigen Anteils wurde aus diesem Inosit pc abgetrennt. Nach dem Herauslösen aus dem Papier mit Wasser konnte der sechswertige zyklische Alkohol mit Perjodsäure oxydativ gespalten werden. Der Perjodsäure-Überschuß wurde jodometrisch bestimmt.

Fleury und Balatre (75) nehmen zwei Reaktionsphasen für die oxydative Spaltung von Inosit durch Perjodsäure an: eine sehr schnell verlaufende, in der über einen hypothetischen Dialdehyd Glykolsäure neben Ameisensäure entsteht;



und eine langsame Phase, in der die Glykolsäure zu Ameisensäure und Kohlendioxyd - allerdings nicht quantitativ - weiteroxydiert wird:



Die Bestimmung ergab für:

Ph I : 6,8% Inosit = 344 g Inosit in 5050 g Ph I

Ph II: 4,8% Inosit = 342 g Inosit in 7120 g Ph II

Diese Werte entsprechen etwa 2 Mol Inosit für beide Phosphatide.

3.3.3.3 Glyzerin

Senft (1) hatte bereits geringe Glyzerinmengen im Wollfett aufgefunden (s. Einleitung Seite 5).

In Ph I und Ph II ließ es sich nach alkalischer (alkoholische KOH) Hydrolyse jeweils im wässrigen Anteil pc nachweisen.

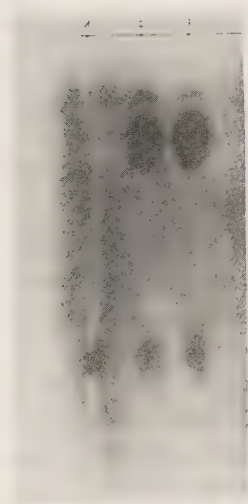


Abbildung 13

Papierchromatogramm zum Nachweis von Glyzerin

1: Glyzerin

2: alkalisches Hydrolysat von Ph I
(wässriger Anteil)

3: alkalisches Hydrolysat von Ph II
(wässriger Anteil)

Fließmittel	:	Butanol	40 ml
		Eisessig	10 ml
		Wasser	10 ml

Sprühreagenz: Silbernitratlösung

Methode : absteigend

Laufzeit : 29 Std.
(Durchlaufchromatogramm)

Bei den etwas länglichen Flecken in der Nähe der Startpunkte 2 und 3 mag es sich um Inositphosphate handeln. Beide ließen sich nämlich

sowohl mit Silbernitrat- (braun) als auch mit Ammoniummolybdat-reagenz (blau) anfärben.

Die quantitative Erfassung von Glycerin erfolgte nach der Methode von Blix (76). Durch Einwirkung von Jodwasserstoffsäure wurde das sich abspaltende Glycerin in flüchtiges Isopropyljodid übergeführt. Beim Auffangen der überdestillierenden Jodverbindung in Brom-Eisessig setzte Brom das Jod als Jodsäure frei, die jodometrisch bestimmt wurde.

Die Bestimmung ergab für:

Ph I : 1,77 % Glycerin = 90,2 g Glycerin in 5050 g Ph I

Ph II: 2,66 % Glycerin = 189,0 g Glycerin in 7120 g Ph II

Danach enthält Ph I 1 Mol Glycerin, Ph II 2 Mol.

3.3.3.4 Aminosäuren

Peptide als Bestandteile von Lipiden und Phospholipiden sind bekannt. Senft (1) und Fülberth (2) machen z.B. entsprechende Angaben.

Auch der Stickstoffgehalt von Ph I und Ph II wird durch Aminosäuren von Peptidanteilen verursacht.

Die Säuren waren ebenso wie die vorher beschriebenen Bestandteile erst nach Säurespaltung der beiden Phospholipide nachweisbar.

Meistens wird 6 n HCl bei 100° C während 16 - 20 Stunden zur vollkommenen Eiweiß- oder Peptidhydrolyse verwendet (77). Dabei tritt jedoch häufig eine beträchtliche Bildung unlöslicher, dunkler Niederschläge auf (Maillard-Reaktion, Melanoide, Huminstoffe). Dadurch werden erhebliche Mengen der Aminosäuren einer Analyse entzogen. Zur Vermeidung dieser unerwünschten Nebenreaktion wurde etwas Phenol (p. a. Merck) dem Hydrolysenansatz zugegeben (78). Nach beendeter Hydrolyse wurde das Phenol durch Ausschütteln mit Äther entfernt und die wässrige Phase im Vakuumexsikkator über KOH

(Rotuli) von HCl befreit. Anschließend wurde in Wasser aufgenommen und analysiert. Dies geschah qualitativ und quantitativ in einem automatischen Aminosäure-Analysiergerät der Firma Bender und Hobein, München ("Apparatur zur quantitativen Aminosäurebestimmung an Ionenaustauschersäulen mit automatischer Registrierung der Ergebnisse durch den Elphor-Integraph")^{x)}

Das Gerät arbeitet nach folgendem Prinzip (79):

Auf eine mit Ionenaustauscher gefüllte Säule wird das zu trennende Substanzgemisch aufpipettiert. Durch einen Druckzylinder wird mit konstanter Geschwindigkeit Pufferlösung durch die Säule gedrückt, sodaß die Elutionsgeschwindigkeit der Säule 30 ml/h beträgt. Dem aus der Ionenaustauschersäule austretenden Eluat, das die Aminosäuren getrennt enthält, wird innerhalb eines Kapillarrohres im konstanten Mischungsverhältnis und mit konstanter Geschwindigkeit durch einen Druckzylinder das Ninhydrinreagenz in einer Menge von 15 ml/h zugeführt. Die Farbentwicklung erfolgt innerhalb von 20 min in einem Teflonschlauch von 1 mm lichter Weite, der sich aufgerollt in einem siedenden Wasserbad befindet. Anschließend durchfließen die angefärbten Komponenten eine Meßdurchlaufküvette (Integraph). Eine automatisch registrierende Photometereinrichtung zeichnet die Extinktionen der verschiedenen Fraktionen fortlaufend auf. Die automatische Trennung und Registrierung der Aminosäureaufteilung erfolgt mit dieser Apparatur innerhalb von 12 Stunden.

Auswertung der Kurven:

Die Abbildung auf Seite 52 zeigt die vom Elphor-Integraphen aufgenommenen Extinktionskurven.

^{x)} Herrn Privatdozent Dr. H. Determann vom Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt a.M. und Frau Katona sei auch an dieser Stelle für die Ausführung der Bestimmung gedankt.

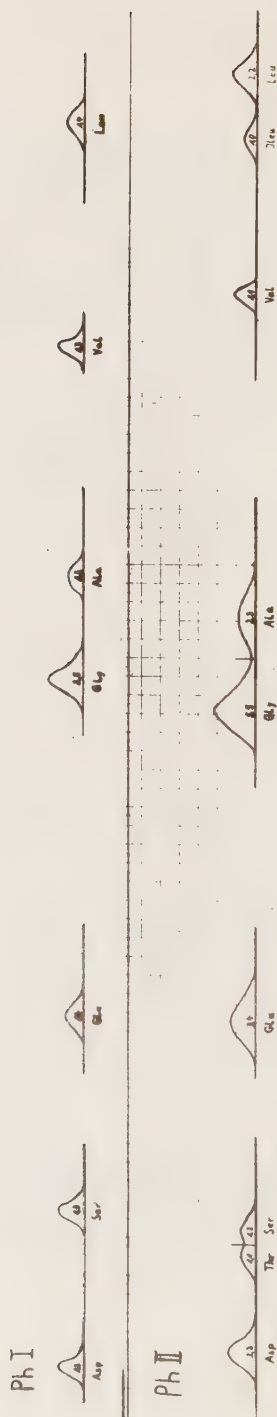


Abbildung 14

Extinktionskurven der Aminosäuren der Peptidanteile von Ph I und Ph II,
aufgenommen mit dem Elphor-Integraphen

Zur Auswertung mußten die Flächenwerte der einzelnen Gauß-Kurven durch Planimetrieren ermittelt werden. Zur exakten Berechnung der Ergebnisse wurden die erhaltenen Flächenwerte durch Dreieransatz den Resultaten einer vorher durchgeführten Testanalyse mit einer eingewogenen und genau bekannten Aminosäuremischung gegenübergestellt. Durch Vergleich der Flächenwerte dieser aufgeteilten Test-Aminosäuremischung mit bekannter Einwaage mit den Flächenwerten des jeweils zu analysierenden Hydrolysates von Ph I und Ph II ließen sich die absoluten Werte der Aminosäuren in Letzteren ermitteln.

Die Molverhältnisse betragen nach den Flächenwerten

<u>bei Ph I:</u>		<u>: 1, 3</u>
Asparaginsäure	1, 3	1
Serin	1, 3	1
Glutaminsäure	1, 4	1, 07~1
Glycin	2, 5	1, 92~2
Alanin	1, 2	0, 92~1
Valin	1, 3	1
Leucin	1, 4	1, 07~1
<u>bei Ph II:</u>		<u>: 1, 1</u>
Asparaginsäure	2, 2	2
Threonin	1, 1	1
Serin	1, 2	1, 09~1
Glutaminsäure	3, 4	3, 09~3
Glycin	5, 5	5
Alanin	2, 3	2, 09~2
Valin	1, 1	1
Isoleucin	1, 0	0, 91~1
Leucin	2, 2	1

Um auf glatte Molverhältnisse zu kommen, wurden die Werte von Ph I durch 1, 3, die Werte von Ph II durch 1, 1 geteilt.

3.3.4 Untersuchungen an den Peptidbestandteilen von Ph I und Ph II

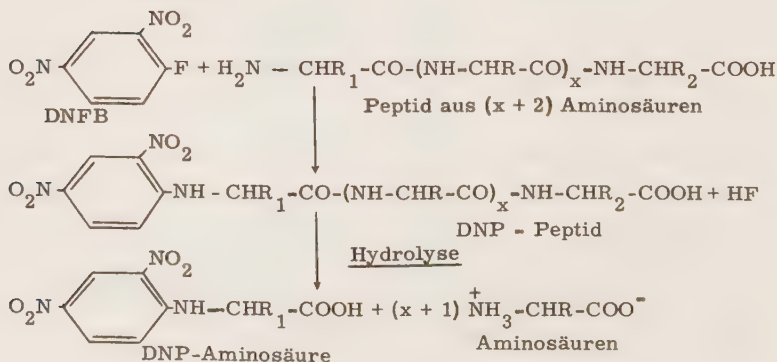
Um die Struktur der Peptidanteile beider Phosphatide etwas genauer kennenzulernen, erfolgte die Bestimmung der C- und der N-terminalen Aminosäure. Dadurch sollte ermittelt werden, welche Aminosäure jeweils das Peptid mit dem Phosphatid verknüpft und welche das Endglied der Peptidkette bildet. Letztere mußte die N-terminale Aminosäure sein, da Ph I und Ph II mit Ninhydrin-reagenz eine positive Reaktion auf freie Aminogruppen gaben, und basische Aminosäuren (Diamino-monocarbonsäuren) abwesend waren. Dem Reagenz war ein Netzmittel zugesetzt worden wegen des lipophilen Charakters von Ph I und Ph II.

3.3.4.1 Bestimmung der endständigen Aminosäure nach Sanger (80-83) mit 2, 4 Dinitrofluorbenzol (DNFB)

Ist die endständige Aminosäure so gebunden, daß ihre Aminogruppe frei bleibt (N-terminal), so läßt sie sich nach Sanger mit 2, 4 Dinitrofluorbenzol ermitteln.

Auf Grund der positiven Ninhydrinreaktion und der Abwesenheit von basischen Aminosäuren (Diamino-monocarbonsäuren) (s. oben) konnte angenommen werden, daß die Voraussetzungen für eine Sanger'sche Endgruppenbestimmung vorlagen.

Schema:



Dinitrophenylaminosäuren (DNP-Aminosäuren) entstehen also, wenn man Proteine oder Peptide mit Dinitrofluorbenzol umsetzt und das Kondensationsprodukt in geeigneter Weise abbaut. Ihre Abtrennung aus dem Reaktionsgemisch und besonders ihre Identifizierung ist von erheblicher Bedeutung, weil die genannten Reaktionsfolgen bei systematischer Anwendung die Sequenzanalyse von Peptidstrukturen ermöglichen. Viele Autoren haben sich mit diesem Problem beschäftigt und auf die auftretenden Schwierigkeiten hingewiesen (84/85).

Vergleichs-DNP-Aminosäuren wurden nach der Vorschrift von Levy und Chung (86) hergestellt. Die Dinitrophenylierung von Ph I und Ph II erfolgte in Anlehnung an das Verfahren von Lockhart und Abraham (87). Nach salzsaurer Hydrolyse konnte aus dem Reaktionsgemisch beider Substanzen DNP-Alanin mit Äther extrahiert werden. Weitere DNP-Aminosäuren tauchten nicht auf, sodaß angenommen werden kann, daß Alanin im Peptidbestandteil beider Phosphatide die endständige Aminosäure ist. Der Nachweis von DNP - Alanin erfolgt dc.

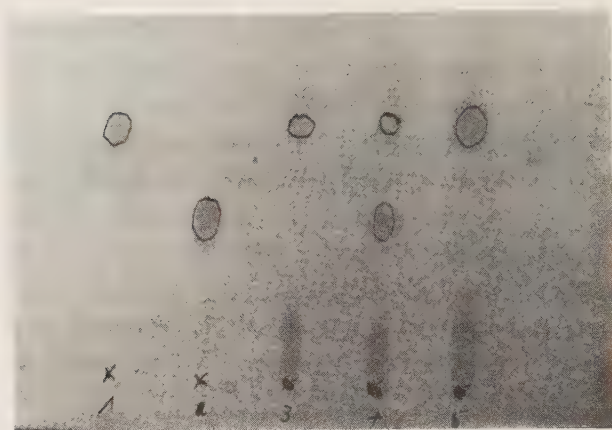


Abbildung 15

Dünnschichtchromatogramm zum Nachweis
von DNP-Alanin

1: DNP-Alanin

2: DNP-Glycin

3: Ätherextrakt des salzsauren Hydrolysates
nach Dinitrophenylierung von Ph I

4: Ätherextrakt des salzsauren Hydrolysates
nach Dinitrophenylierung von Ph I + DNP Glycin

5: Ätherextrakt des salzsauren Hydrolysates
nach Dinitrophenylierung von Ph I + DNP Alanin

Fließmittel: Chloroform 95 ml

Methanol 5 ml

Eisessig 1 ml

Kieselgel G (Merck)

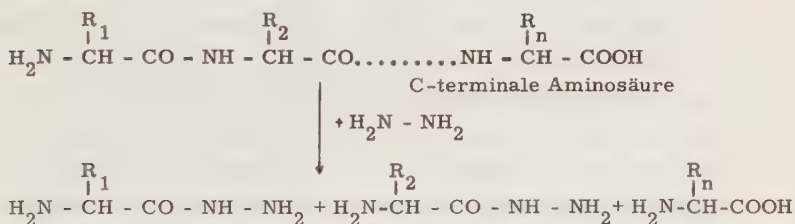
Die DNP-Derivate waren auf Grund ihrer gelben Farbe leicht erkennbar.

Die DNP-Aminosäure aus Ph I (s. Abbildung 15) hatte den gleichen Rf-Wert wie DNP-Alanin und lief mit letzterer gemischt als einheitlicher Fleck. Danach steht Alanin als N-terminale Aminosäure in Ph I fest. Für Ph II ergab sich das gleiche Bild.

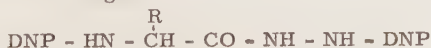
3.3.4.2 Bestimmung der C-terminalen Aminosäure nach Akabori (88/89)

Prinzip:

Die C-terminalen Aminosäuren von Proteinen oder Peptiden werden durch Behandlung mit wasserfreiem Hydrazin in Freiheit gesetzt. Die übrigen Aminosäuren, die sich in Peptidbindung befinden, werden in Säurehydrazide verwandelt.



Die Aminosäurehydrazide nebst den freigewordenen C-terminalen Aminosäuren werden nun durch Dinitrophenylierung (Umsetzen mit 2,4-Dinitrofluorbenzol) in die entsprechenden Di-DNP- bzw. Mono-DNP-Derivate übergeführt.



Di-DNP-Derivat eines
Aminosäurehydrazids



Mono-DNP-Derivat einer
C-terminalen Aminosäure

Beide sind in Äthylacetat löslich, letztere lassen sich jedoch aus dem Ester mit Natriumbicarbonatlösung extrahieren. Auf diese Weise werden C-terminale Aminosäuren isoliert.

Um die C-terminale Aminosäure des Peptidanteils von Ph I und Ph II bestimmen zu können, mußte dieser zunächst einmal unverändert vom Gesamtmolekül abgespalten werden. Es war wahrscheinlich, daß er über die C-terminale Aminosäure mit Phosphorsäure verknüpft war, da ja die N-terminale Aminosäure direkt nachweisbar war durch Dinitrophenylierung des Gesamtmoleküls und anschließende Spaltung. Letztere mußte also das freie Ende des Peptidrestes darstellen.

Die Abspaltung des Peptidrestes von Ph I und Ph II gelang durch Stehenlassen beider Substanzen mit 0,25 n NaOH bei Raumtemperatur über Nacht (90). Nach Filtration, Neutralisation und Einengen des wäßrigen Hydrolysates wurde dieses untersucht. Auf dem entwickelten Chromatogramm ließ sich nur ein einziger Fleck in der Nähe des Startpunktes mit Ninhydrin anfärben. Das gleiche Hydrolysat wurde danach mit 6 n HCl bei 100° C über Nacht hydrolysiert. Nach Verjagen der Salzsäure und Einengen (im Vakuumexsikkator über KOH) ließen sich nun mehrere Flecke (Aminosäuren) auf einem Dünnschichtchromatogramm mit Ninhydrin anfärben. Daraus kann gefolgert werden, daß die Aminosäuren von Ph I und Ph II mit 0,25 n NaOH als Peptid abspaltbar sind.

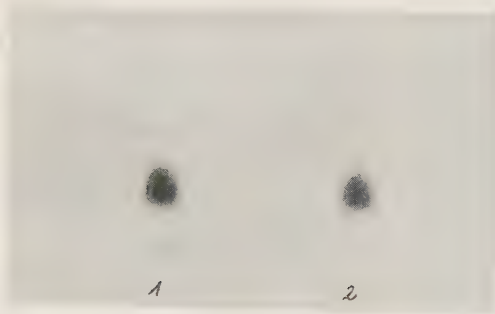


Abbildung 16

Dünnschichtchromatogramm zum Nachweis
der Peptidreste von Ph I und Ph II

1: Ph I, mit 0,25 n NaOH behandelt, davon
wässriges Hydrolysat

2: Ph II, mit 0,25 n NaOH behandelt, davon
wässriges Hydrolysat

Kieselgel G

Sprühreagenz: Ninhydrin

Fließmittel	:	n-Propanol	50 ml
		Äthylacetat	10 ml
		Wasser	30 ml
		Ammoniak	10 ml

Abbildung 17

Dünnschichtchromatogramm zum Nachweis einzelner Aminosäuren der Peptidreste von Ph I und Ph II

- 1: Ph I, mit 0,25 n NaOH behandelt, wässriges Hydrolysat davon mit 6 n HCl hydrolysiert
- 2: Ph II, mit 0,25 n NaOH behandelt, wässriges Hydrolysat davon mit 6 n HCl hydrolysiert

Sonstige Bedingungen wie bei Abb. 16



Es wurde geprüft, ob Ph I und Ph II nach Behandeln mit 0,25 n NaOH noch Aminosäuren enthielten, ob also der Peptidanteil nicht quantitativ abgespalten wurde. Dazu wurde der nach NaOH-Behandlung abfiltrierte Fettanteil beider Phosphatide wie in Kapitel 3.3.4.1 mit 2,4 Dinitrofluorbenzol behandelt und anschließend hydrolysiert. Es ließen sich jedoch im Hydrolysat keine DNP-Aminosäuren mehr nachweisen. Nun stand fest, daß die Aminosäuren von Ph I und Ph II quantitativ als Peptid abgetrennt worden waren.

Die in Abbildung 16 chromatographierten Hydrolysate 1 und 2 gaben mit Ammoniummolybdat- und Silbernitratreagenz keine positiven Reaktionen. Daraus folgt, daß weder Phosphorsäure noch Glycerin oder Inosit abgespalten wurden.

Die auf die oben beschriebene Weise erhaltenen Peptide von Ph I und Ph II wurden nun mit wasserfreiem Hydrazin umgesetzt. Nach

dem Entfernen überschüssigen Hydrazins im Vakuumexsikkator über konzentrierter Schwefelsäure wurde der Rückstand in natriumbicarbonathaltiger wäßriger Lösung dinitrophenyliert. Nach dem Ansäuern konnten die DNP-Derivate mit Äthylacetat extrahiert werden. Die sauren DNP-Abkömmlinge wie Di-DNP-Glutaminsäuremonohydrazid, Di-DNP-Asparaginsäuremonohydrazid und die C-terminale DNP-Aminosäure wurden aus dem Essigsäureäthylester mit Natriumbicarbonatlösung extrahiert, durch Ansäuern ausgefällt, wiederum mit Äthylacetat ausgeschüttelt und dc untersucht.

Abbildung 18

Dünnschichtchromatogramm zur Ermittlung der C-terminalen Aminosäure von Ph I und Ph II

- 1: Di-DNP-Hydrazin
 - 2: DNP-Serin
 - 3: C-terminale Aminosäure von Ph I
 - 4: C-terminale Aminosäure von Ph II
- Kieselgel G

Fließmittel:	Chloroform	95 ml
	Methanol	5 ml
	Essigsäure	1 ml

Farbe aller DNP-Derivate: gelb



Aus dem Dünnschichtchromatogramm geht hervor, daß Serin jeweils die C-terminale Aminosäure der Peptidreste von Ph I und Ph II ist. In Bahn 3 und 4 ist noch je ein größerer Fleck (umrandet) zu erkennen. Es mag sich dabei um Dinitrophenol oder die sauren Di-DNP-Derivate von Glutaminsäure- und Asparaginsäuremonohydrazid handeln.

Nach den hydrophilen Spaltprodukten wurden die lipophilen untersucht.

3.3.5 Lipophile Spaltprodukte von Ph I und Ph II

Es ist bekannt, daß Sterine in vielen Fällen Bestandteile von Phosphatiden sein können.

3.3.5.1 Cholesterin

Fülberth (2) hatte festgestellt, daß das Verseifungsmittel von Einfluß auf den Sterinnachweis war. Er konnte nachweisen, daß Cholesterin von methanolischer Schwefelsäure zum Teil verändert wird. Besser eignete sich Natriumäthylat.

Bei dieser Arbeit wurden diese Hydrolysemittel durch alkoholische Kalilauge ersetzt, da sich Ph I und Ph II besser darin lösten.

In Ph I fehlte Cholesterin, es ließ sich nur in Ph II nachweisen und zwar dc, durch Digitoninfällung (91) und mit Hilfe der Liebermann-Burchard Reaktion (92).

Abbildung 19

Dünnschichtchromatogramm zum Nachweis von Cholesterin in Ph II

- 1: lipophiler Anteil der alkoholischen KOH-Verseifung von Ph II
- 2: Cholesterin (Merck)
- 3: Lanosterin (Roth)
- 4: lipophiler Anteil der alkoholischen KOH-Verseifung von Ph I

Kieselgel G

Sprühreagenz: Antimon-3-chlorid

Fließmittel : Chloroform

Der Cholesterinfleck und der mit ihm auf gleicher Höhe liegende von Startbahn 1 färbten sich mit Antimon-3-chlorid violettrosa, mit Phosphorwolframsäure rötlich.

Quantitativ wurde das Cholesterin nach Jäneck e und Senft (93) bestimmt. - Nach alkalischer Hydrolyse erfolgte die Abtrennung des Cholesterins zunächst dc auf Kieselgel G Platten mit

n-Propanol	50 ml
Essigester	10 ml
Wasser	30 ml
Ammoniak	10 ml

als Fließmittel von den anderen lipophilen Spaltprodukten (Fettsäuren). Das Sterin wanderte fast mit der Fließmittelfront während die Fettsäuren in der Mitte der Platte verblieben. Nach dem Wegtrocknen des Fließmittels wurde die Zone, in der das Cholesterin saß, ausgekratzt und im Mikrosoxhlet mit Chloroform extrahiert. Die Höhe der Zone wurde durch einen am Rand der Platte mitgelaufenen Cholesterinfleck, der allein angefärbt worden war, angezeigt. Die Breite der Zone betrug etwa 12 cm, da die Lösung des lipophilen Hydrolysenanteils strichförmig und nicht punktförmig aufgetragen worden war.

Der Chloroformextrakt wurde in einem Meßkölbchen zu 10 ml Chloroform gelöst, mit einer bestimmten Menge eines besonders zusammengesetzten Liebermann-Burchard-Reagenzes (93) versetzt und für die sich bildende charakteristische Grünfärbung bei 620 nm im Zeiß-Opton Spektralphotometer die Extinktion bestimmt. Zuvor war unter gleichen Bedingungen mit wechselnden Mengen von Cholesterin (Merck) eine Eichkurve aufgestellt worden, an der nun der Sterin-gehalt von Ph II abgelesen werden konnte.

20 mg Ph II enthielten laut Eichkurve 1,1 mg Cholesterin = 5,5 % oder 392 g in 7 120 g Ph II. Das entspricht 1 Mol Cholesterin in Ph II. (Extinktion: 0,21, 620 nm, 1 cm Küvette gegen reines Chloroform gemessen.)

3.3.5.2 Fettsäuren

Auf Grund der Gegenwart von Glycerin und Phosphorsäure (Glycerinphosphatidstruktur) war die Anwesenheit von Fettsäuren sehr wahrscheinlich, denn sie stehen als Bestandteile fast aller bis jetzt bekannten Phosphatide fest.

Wiederum nach alkalischer Hydrolyse (alkoholische KOH, s. auch Kapitel 3.3.5.1) ließen sich im lipophilen Anteil von Ph I und Ph II mehrere Fettsäuren nachweisen. Sie konnten pc und dc identifiziert werden. Beide Methoden wurden nach den Vorschriften von Kaufmann (94, 95, 96, 97) durchgeführt. Die PC erfolgte auf mit Undecan (stand. nach Kaufmann) oder Paraffinum liquidum imprägniertem Papier. Bei der DC kamen mit Undecan (stand. nach Kaufmann) imprägnierte Gipschichten nach Kaufmann (96) zur Anwendung. Die Sichtbarmachung erfolgte durch Rubeanwasserstoffsäure, die die beim Eintauchen der Chromatogramme in Kupferacetatlösung entstandenen Kupferseifen grün färbte. Die Entwicklung erfolgte mit Eisessig (Papierchromatogramme) bzw. Eisessig-Acetonitril 1+1 (Dünnschichtchromatogramme).

Es fällt auf, daß ausschließlich Fettsäuren mit längeren Kohlenstoffketten vorliegen. Die Anwesenheit einer Hydroxyfettsäure ist sicher.



Abbildung 20

Papierchromatogramm zur Identifizierung der Fettsäuren in Ph I

- 1: Cerotinsäure
- 2: Palmitinsäure
- 3: 12-Hydroxystearinsäure
- 4: Fettsäuren von Ph I
- 5: Stearinsäure
- 6: Lignocerinsäure

Anfärbung : Cu-acetat
Rubeanwasserstoffsäure

imprägniert mit: Paraffinum liquidum

Fließmittel : Essigsäure 100%ig

Laufzeit : 15 Std.

Papier : Schleicher & Schüll Mgl



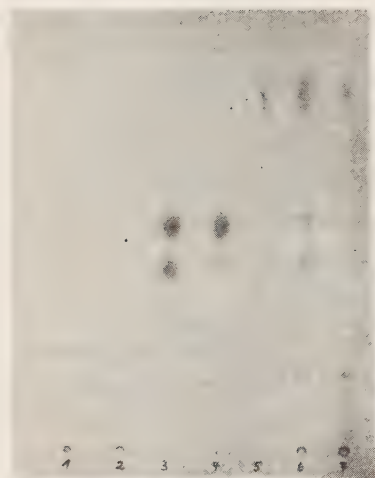
Abbildung 21

Papierchromatogramm zur Identifizierung der Fettsäuren in Ph II

- 1: Cerotinsäure
- 2: Lignocerinsäure
- 3: 12-Hydroxystearinsäure
- 4: Fettsäuren von Ph II

Sonstige Bedingungen wie Abbildung 20

Abbildung 22



Dünnschichtchromatogramm zur Identifizierung der Fettsäuren in Ph I und Ph II

- 1: Cerotinsäure
- 2: Lignocerinsäure
- 3: Stearinsäure + Palmitinsäure
- 4: Palmitinsäure
- 5: 12-Hydroxystearinsäure
- 6: Fettsäuren von Ph I
- 7: Fettsäuren von Ph II

Gipsschicht nach Kaufmann (96)

Anfärbung : Cu - acetat
Rubeanwasserstoff

imprägniert mit: Undecan (stand. nach
Kaufmann)

Fließmittel : Essigsäure 100%ig 50 ml
Acetonitril 50 ml

Fettsäuren mit mehr als 26 C Atomen schieden aus, da diese auf einem mit Eisessig (100%ig) entwickelten Dünnschichtchromatogramm am Startpunkt verblieben, während alle Fettsäuren von Ph I und Ph II wanderten. Mit diesem Fließmittel war jedoch eine Unterscheidung der oben aufgeführten Fettsäuren untereinander schlecht möglich, da sie bis auf Cerotinsäure sehr dicht in der Nähe der Fließmittelfront zusammenlagen. Das war jedoch in diesem Falle unwesentlich, da dieser Versuch lediglich dazu diente, zu erfahren, ob Ph I und Ph II noch höhere Fettsäuren als Cerotinsäure enthalten. Um ungesättigte Fettsäuren konnte es sich auch nicht handeln, da die Flecke auf beiden Chromatogrammen nicht mit Joddämpfen braun anfärbbar waren (53). Außerdem wurden die Gesamtfettsäuren (lipophile Anteile nach alkalischer Hydrolyse) von Ph I und Ph II einer Mikro-Jodzahlbestimmung nach Kaufmann (98) unterworfen. Aus dem Ergebnis der Bes. 1-

mung ging hervor, daß keine Bromanlagerung stattgefunden hatte.

Aus vielen pc und dc Untersuchungen ging schließlich hervor, daß

Ph I : Hydroxystearinsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure, Lignocerin- und Cerotinsäure,

Ph II: Hydroxystearinsäure, Lignocerin- und Cerotinsäure

enthalten. - Zur noch genaueren Kennzeichnung der Hydroxysäure wurde eine Säurezahl- und eine Hydroxylzahlbestimmung ausgeführt.

Die Einteilung der Kennzahlen, ihre Abkürzungen und Schreibweise erfolgten nach Kaufmann (98). Die Fettsäuren von Ph I und Ph II

wurden pc (Bedingungen wie unter Abb. 20 und 21) aufgetrennt. Die

bis zur Höhe der Vergleichs-12-Hydroxystearinsäure gelaufenen

Flecke (ohne Anfärbung) wurden ausgeschnitten und im Mikrosoxhlet

mit Chloroform extrahiert. Nach Verjagen des Extraktionsmittels

konnten obige Bestimmungen vorgenommen werden.

Säurezahl (SZ): Sie gibt die Anzahl mg KOH an, die notwendig ist, um die in 1 g Fett enthaltenen freien organischen Säuren zu neutralisieren.

$$SZ = \frac{a \cdot 28,05}{E}$$

a = verbrauchte ml 0,5 n KOH

E = Einwaage in g

Die Säurezahl einer reinen Fettsäure ist eine Materialkonstante, die zur Identifizierung bzw. Prüfung des Reinheitsgrades von Fettsäurepräparaten dienen kann. Sie ist eine Funktion des Molekulargewichtes, das unter Berücksichtigung der Definition der Säurezahl folgendermaßen mit ihr zusammenhängt:

$$SZ = \frac{56 \cdot 104}{MG}$$

Die theoretische Säurezahl von Hydroxystearinsäure (MG 300,3) ist demnach: 186,8.

Die Bestimmung der Säurezahl im Mikromaßstab für die anscheinend vorliegende 12-Hydroxystearinsäure ergab

$$SZ = 183,8$$

Hydroxylzahl (OHZ): Sie gibt die Anzahl mg KOH an, die notwendig ist, um die von 1 g Fett bei der Acetylierung verbrauchte Essigsäure zu neutralisieren.

Die Hydroxylzahl dient zur Ermittlung des Gehaltes an Hydroxylgruppen.

$$\text{OHZ} = \frac{(b - a) \cdot 28,05}{E} + \text{SZ}$$

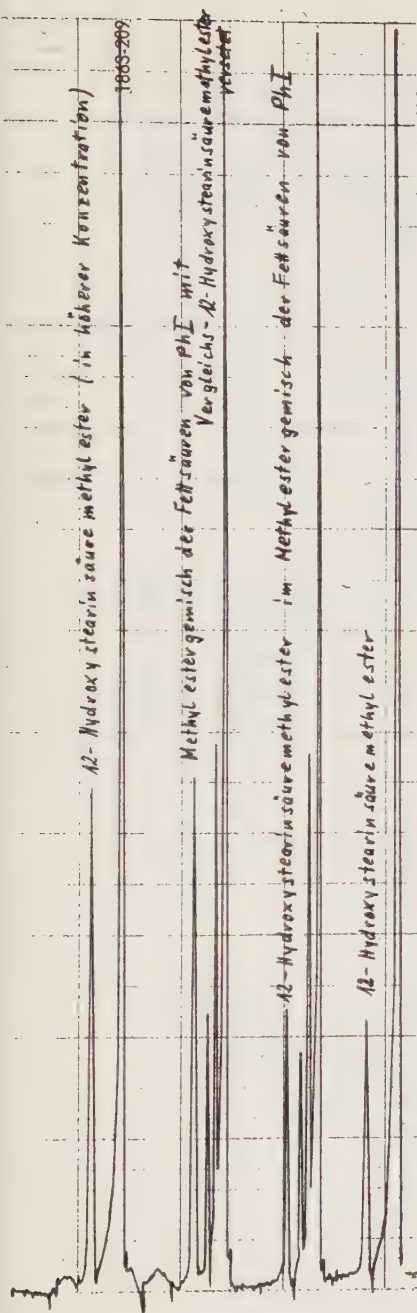
- a = verbrauchte ml 0,5 n KOH im Hauptversuch
b = verbrauchte ml 0,5 n KOH im Blindversuch
E = Einwaage in g

Theoretisch sind bei Monohydroxyfettsäuren die Zahlenwerte für Säure- und Hydroxylzahl gleich, da bei der Bestimmung der zweiten Kennzahl für Haupt- und Blindversuch gleiche Mengen KOH verbraucht werden, sodaß der Quotient in der Summe (siehe Formel) 0 wird und nur noch die Säurezahl stehen bleibt. Die gleichen Verbrauchsmengen kommen daher, daß im Blindversuch das gesamte vorgelegte Essigsäureanhydrid als Essigsäure zurücktitriert wird, während im Hauptversuch ein Äquivalent Essigsäure von der Hydroxylgruppe der Monohydroxyfettsäure gebunden wird, somit also der Rücktitration entgeht. Anstelle dieses einen Äquivalents Essigsäure wird nun jedoch die Carboxylgruppe der Fettsäure miterfaßt.

Bei der Bestimmung der OHZ der Hydroxystearinsäure wurden tatsächlich im Haupt- und Blindversuch gleiche Mengen KOH verbraucht, sodaß eine Monohydroxyfettsäure vorliegen muß.

$$\text{OHZ} = \text{O} + \text{SZ} = 183,8$$

Auf Grund dieser Ergebnisse und der guten Rf-Wert-Übereinstimmung (Hydroxysäuren, bei denen die Hydroxygruppe sich nahe an der Carboxylgruppe befindet, haben nur einen geringen Rf-Wert-Unterschied im Vergleich zu der unsubstituierten Stammsäure (99)) auf den Chromatogrammen war sicher, daß Ph I und Ph II Hydroxystearinsäure (wahrscheinlich die 12-Hydroxystearinsäure) enthalten. Die ganz genaue Lokalisierung des Substituenten blieb jedoch offen.



Deshalb schloß sich noch eine gaschromatographische Untersuchung der Fettsäuren von Ph I und Ph II an. Dazu wurden sie und die erforderliche Vergleichs-12-Hydroxystearinsäure mit BF_3 -Methanol nach der Methode von Metcalfe und Schmitz (109) in ihre Methylester verwandelt. Die Analyse (110) erfolgte in einem Becker-Gaschromatographen (Delft, Holland). (Zwei parallel geschaltete Kolonnen und doppelte FID.)

Trärgas : N_2
 Trägermaterial : Kieselgur 0,2 - 0,3 mm mit 5% Silicongummi SE 30
 Säulenlänge : 120 cm
 Säulendurchmesser: 4 mm
 Temperatur : 260°C

In nebenstehendem Gaschromatogramm ist deutlich zu erkennen, daß der Peak des 12-Hydroxystearinsäuremethylesters im Fettsäuremethylestergemisch von Ph I auftaucht. Im Gemisch beider tauchte kein zusätzlicher Peak auf. Für Ph II ergab sich das gleiche Ergebnis, sodaß 12-Hydroxystearinsäure als Bestandteil beider Phosphatide angenommen werden kann.

Abbildung 22a

Zwecks quantitativer Bestimmung der Fettsäuren wurden diese zunächst wieder pc getrennt, die Zonen der einzelnen Säuren (der lipophile Anteil des alkalischen Hydrolysates war strichförmig aufgetragen worden) nach guter Trocknung des Papiers ausgeschnitten und im Mikrosoxhlet mit Chloroform extrahiert. Nach Verjagen des Extraktionsmittels und Trocknung im Vakuumexsikkator bis zur Gewichtskonstanz kamen die einzelnen Säuren zur Auswaage.

Ph I :	von 2,83 mg Gesamtfettsäuren	entfielen 1,26 mg auf Hydroxystearinsäure	44,6%
" "	" "	" 0,20 "	" Palmitinsäure 7,2%
" "	" "	" 0,22 "	" Stearinsäure 7,7%
" "	" "	" 0,51 "	" Lignocerinsäure 18,0%
" "	" "	" 0,56 "	" Cerotinsäure 20,0%

Ph II:	von 2,10 mg Gesamtfettsäuren und Cholesterin	entfielen 1,16 mg auf Hydroxystearinsäure	55,0%
" "	" "	" "	entfielen 0,37 mg auf Cerotinsäure 17,5%
" "	" "	" "	entfielen 0,34 mg auf Lignocerinsäure 16,0%

3.4 Molekülaufbau

Nachdem nun die Molekulargewichte und die einzelnen Bausteine quantitativ bestimmt waren, können Vorschläge zum strukturellen Aufbau von Ph I und Ph II ausgearbeitet werden.

3.4.1 Ph I:

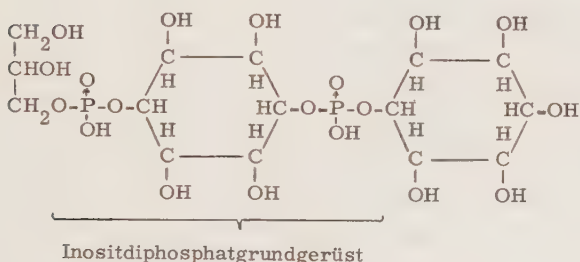
Die Totalhydrolyse ergab für die hydrophilen Bestandteile:

1 Mol Glyzerin, 2 Mol Inosit, 2 Mol Phosphorsäure und einen Peptidanteil, bestehend aus folgenden Aminosäuren:

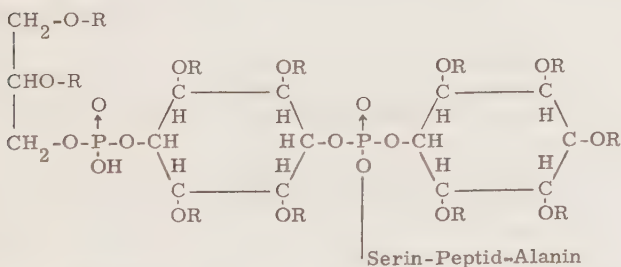
Asparaginsäure, Serin, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Valin und Leucin.

Die Partialhydrolyse (3, 3, 3, 1) lieferte u. a. : Inositdiphosphat und -monophosphat.

Der Diester wurde als Grundgerüst des Moleküls angesehen, an welchem noch eine Inosit- und eine Glycerinmolekel verestert sind.



Der Peptidanteil ist über Serin wahrscheinlich mit einer der beiden Phosphorsäuren verbunden. Serinphosphorsäure ist als Bestandteil von Phosphatiden (Phosphatidylserin) und Phosphorproteiden (Casein) bekannt. Die Fettsäuren können am Glycerin und an beiden Inositmolekülen verestert sein. Nach Hanahan (3) ist es durchaus möglich, daß in Phosphoinositiden die Fettsäuren sowohl am Glycerin als auch am Inosit verestert sind, sodaß Ph I folgende Strukturformel zugeschrieben werden kann:



R = Fettsäuren:

Hydroxystearinsäure, Stearinsäure, Palmitinsäure, Lignocerinsäure, Cerotinsäure.

Zusammenstellung der wasserlöslichen Einzelbestandteile und ihre Verteilung im Molekül:

	2 Mol Inosit	(MG 180, 15) ergibt:	360, 30
	1 Mol Glyzerin	(MG 92, 09) "	92, 09
	2 Mol Phosphorsäure	(MG 97, 99) "	195, 98
Peptidanteil:	1 Mol Asparaginsäure	(MG 133, 10) "	133, 10
	1 Mol Serin	(MG 105, 09) "	105, 09
	1 Mol Glutaminsäure	(MG 147, 13) "	147, 13
	2 Mol Glycin	(MG 75, 07) "	150, 14
	1 Mol Alanin	(MG 89, 09) "	89, 09
	1 Mol Valin	(MG 117, 15) "	117, 15
	1 Mol Leucin	(MG 131, 17) "	<u>131, 17</u>
			1 521, 24
			- <u>216, 19</u>
			1 305, 05

(216, 19 = 12 H₂O, die bei der Kondensation der Einzelbestandteile frei werden.)

Daß es sich bei den Aminosäuren nicht um ein Vielfaches der ermittelten Molverhältnisse handeln konnte, geht aus dem Stickstoffgehalt von Ph I hervor. Er betrug 2, 1% (ermittelt nach Kjeldahl, siehe 3. 3. 1).

Die obigen 8 Mol Aminosäuren enthalten 112, 06 g Stickstoff (MG 14, 006). 112, 06 g von 5 050 g (MG von Ph I) sind: 2, 22 %

Die obige Aufstellung stellt den wasserlöslichen Anteil von Ph I dar. 1 305, 0 g von 5 050 g = 25, 8 %

Gravimetrisch waren 25, 0 % ermittelt worden (siehe 3. 3. 2).

Theoretisch müßten also

$$\begin{array}{r}
 5\,050 \text{ g MG von Ph I} \\
 - \quad 1\,305 \text{ g MG des hydrophilen Anteils von Ph I} \\
 \hline
 3\,745 \text{ g} \\
 =====
 \end{array}$$

als lipophiler Anteil (Fettsäuren) von Ph I verbleiben.

In Kapitel 3.3.5.2 war ermittelt worden, daß auf den lipophilen Anteil

44,6 %	der Gesamtfettsäuren	auf Hydroxystearinsäure	(MG 300,30)
7,2 %	"	"	Palmitinsäure (MG 256,42)
7,7 %	"	"	Stearinsäure (MG 284,47)
19,0 %	"	"	Lignocerinsäure (MG 368,62)
20,0 %	"	"	Cerotinsäure (MG 396,68)

entfallen.

$$\begin{aligned}
 44,6 \% \text{ von } 3\,745 \text{ g} &= 1\,670 \text{ g}; \frac{1\,670}{300,3} = 5,5 \sim 5 \text{ Mol Hydroxystearinsäure} \\
 7,2 \% \text{ von } 3\,745 \text{ g} &= 270 \text{ g}; \frac{270}{256,42} = 1,05 \sim 1 \text{ Mol Palmitinsäure} \\
 7,7 \% \text{ von } 3\,745 \text{ g} &= 288 \text{ g}; \frac{288}{284,47} = 1,01 \sim 1 \text{ Mol Stearinsäure} \\
 19,0 \% \text{ von } 3\,745 \text{ g} &= 712 \text{ g}; \frac{712}{368,62} = 1,93 \sim 2 \text{ Mol Lignocerinsäure} \\
 20,0 \% \text{ von } 3\,745 \text{ g} &= 749 \text{ g}; \frac{749}{396,68} = 1,89 \sim 2 \text{ Mol Cerotinsäure}
 \end{aligned}$$

Der experimentell ermittelte lipophile Anteil von Ph I ergab:

$$5 \times 300,30 = 1\,501,50 \text{ (5 Mol Hydroxystearinsäure)}$$

$$1 \times 256,42 = 256,42 \text{ (1 Mol Palmitinsäure)}$$

$$1 \times 284,47 = 284,47 \text{ (1 Mol Stearinsäure)}$$

$$2 \times 368,62 = 737,24 \text{ (2 Mol Lignocerinsäure)}$$

$$2 \times 396,68 = \underline{793,36} \text{ (2 Mol Cerotinsäure)}$$

$$\begin{aligned}
 &3\,572,99 \\
 &=====
 \end{aligned}$$

$$1\,305,05 \text{ (hydrophiler Anteil von Ph I)}$$

$$+ \underline{3\,572,99} \text{ (lipophiler Anteil von Ph I)}$$

$$4\,878,04$$

$$- \underline{198,00} \text{ (11 H}_2\text{O, die bei Veresterung frei werden)}$$

$$4\,680,04 \sim 4\,700 = \text{MG von Ph I (durch Zusammenzählen der Einzelbestandteile erhalten)}$$

$$5\,050 = \text{MG von Ph I (im Dampfdruckosmometer gemessen)}$$

3.4.2 Ph II:

Die Totalhydrolyse ergab für die hydrophilen Bestandteile:

2 Mol Glycerin, 2 Mol Inosit, 3 Mol Phosphorsäure und einen Peptidanteil bestehend aus:

Asparaginsäure, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin.

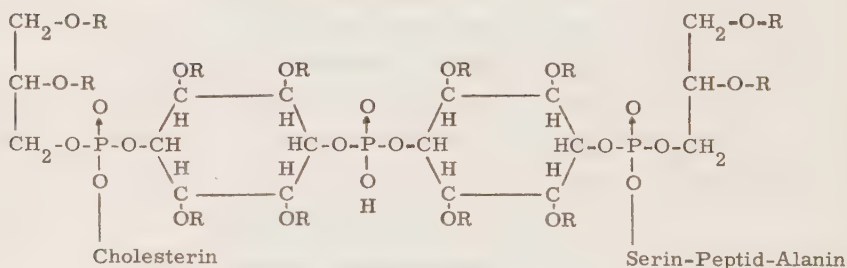
Die Partialhydrolyse (3.3.3.1) lieferte auch hier u. a.: Inositdiphosphat und -monophosphat.

Die beiden Ester wurden als Grundgerüst des Moleküls angesehen und zwar polyinositphosphatartig:

Phosphorsäure - Inosit - Phosphorsäure - Inosit - Phosphorsäure

Die 2 Mol Glycerin können jeweils am Ende dieser Kette mit Phosphorsäure verbunden sein. Der Peptidanteil und die Fettsäuren sind wie in Ph I verknüpft. Cholesterin (Ph II enthält dieses Sterin im Gegensatz zu Ph I) ist sicherlich mit einer der Phosphorsäuren verestert.

Ph II kann daher wie folgt aussehen:



R = Fettsäuren:

Hydroxystearinsäure, Lignocerinsäure, Cerotinsäure.

Zusammenstellung der wasserlöslichen Einzelbestandteile und ihre Verteilung im Molekül

2 Mol Inosit	(MG 180, 15) ergibt:	360, 30
2 Mol Glycerin	(MG 92, 09) "	184, 18
3 Mol Phosphorsäure	(MG 97, 99) "	293, 97

Peptidanteil: 2 Mol Asparaginsäure	(MG 133, 10)	ergibt: 266, 20
1 Mol Threonin	(MG 119, 12)	" 119, 12
1 Mol Serin	(MG 105, 09)	" 105, 09
3 Mol Glutaminsäure	(MG 147, 13)	" 441, 39
5 Mol Glycin	(MG 75, 07)	" 375, 35
2 Mol Alanin	(MG 89, 09)	" 178, 18
1 Mol Isoleucin	(MG 131, 17)	" 131, 17
2 Mol Leucin	(MG 131, 17)	" 262, 34
1 Mol Valin	(MG 117, 15)	" <u>117, 15</u>
		2 934, 44
		- <u>432, 00</u>
		2 502, 44
		=====

(432, 00 = 24 H₂O, die beim Verknüpfen der Einzelbestandteile frei werden.)

Stickstoffgehalt von Ph II: 3,5% (ermittelt nach Kjeldahl, siehe 3.3.1).

Die obigen 18 Mol Aminosäuren enthalten 252 g Stickstoff (MG 14,006).
252 von 7 120 = 3,54%

2 502, 44 = wasserlöslicher Anteil von Ph II (MG 7 120) = 35,2%.

Gravimetrisch waren 37,0% ermittelt worden (siehe 3.3.2).

Als lipophiler Anteil (Fettsäuren und Cholesterin) verbleiben theoretisch:

$$\begin{array}{r}
 7\,120 \text{ g (MG von Ph II)} \\
 - \quad 2\,502 \text{ g (MG des hydrophilen Anteils von Ph II)} \\
 \hline
 4\,618 \text{ g} \\
 =====
 \end{array}$$

In Kapitel 3.3.5.2 war ermittelt worden, daß auf den lipophilen Anteil

55,0 % der Gesamtfettsäuren und Cholesterin auf Hydroxystearinsäure
(MG 300,30)

17,5 % der Gesamtfettsäuren und Cholesterin auf Cerotinsäure
(MG 396,68)

16,0 % der Gesamtfettsäuren und Cholesterin auf Lignocerinsäure
(MG 368,62)

entfallen.

55,0 % von 4 618 = $2\,540 \frac{2\,540}{300,30}$ = 8,4 ~ 8 Mol Hydroxystearinsäure

17,5 % von 4 618 = $807 \frac{807}{396,68}$ = 2,03 ~ 2 Mol Cerotinsäure

16,0 % von 4 618 = $738 \frac{738}{368,62}$ = 2,0 ~ 2 Mol Lignocerinsäure

Der experimentell ermittelte lipophile Anteil von Ph II ergab:

8 x 300,30 = 2 402,40 (8 Mol Hydroxystearinsäure)

2 x 396,68 = 793,36 (2 Mol Cerotinsäure)

2 x 368,62 = 737,24 (2 Mol Lignocerinsäure)

3 933,00

+ 386,67 (Cholesterin)

4 319,67

=====

2 502,44 (hydrophiler Anteil von Ph II)

+ 4 319,67 (lipophiler Anteil von Ph II)

6 822,11

- 234,00 (13 H₂O, die bei der Veresterung frei werden)

6 588,11 ~ 6 600 = MG von Ph II (durch Addition der Einzelbestandteile erhalten)

7 120 = MG von Ph II (im Dampfdruck-osmometer gemessen)

In beiden Phosphatiden waren emissionsspektrographisch folgende

Metalle nachzuweisen ^{x)}: Ca und Mg, daneben noch in geringer Menge

x) Herrn Dr. K. Pfeilsticker vom Institut für Lebensmittelchemie der Universität Frankfurt a.M. sei an dieser Stelle für seine Hilfe bei der Untersuchung auf Metalle gedankt.

Mn und Si. Letzteres mag während der Gewinnung (Kieselgel) eingeschleppt worden sein.

Da in Ph I und Ph II je eine Phosphorsäuregruppe unverestert bleibt, ist an eine salzartige Bindung der Metalle zu denken, wenn auch andere Möglichkeiten nicht auszuschließen sind. Außerdem kommen noch die in den Peptidresten vorhandenen Carboxylgruppen von Asparagin- und Glutaminsäure zur Bindung der Metalle in Frage.

3.5

Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, möglichst das von Fülberth (2) aus Wollfett isolierte Phospholipid (Phosphatid) wieder zu erhalten und dieses quantitativ zu untersuchen. - Trotz Anwendung der gleichen Isolierungsmethode wurde ein zwar ähnliches (weitgehende Übereinstimmung der IR-Spektren) jedoch etwas anders zusammengesetztes Phospholipid erhalten. -

Gemeinsam mit dem Fülberth'schen Phosphatid haben Ph I und Ph II den Gehalt an Inosit, Phosphorsäure, einem Peptidanteil und Cholesterin (letzteres gilt jedoch nur für Ph II). Die Inosit-diphosphorsäure dürfte in allen drei Phosphatiden das Grundgerüst bilden. Die Peptidanteile variieren bei Ph I und Ph II und sind wiederum in ihrer Zusammensetzung von dem Peptidanteil des Fülberth'schen Phosphatids verschieden. Der auffallendste Unterschied besteht darin, daß Ph I und Ph II keine basischen Aminosäuren (Lysin und Arginin) und keine Cysteinsäure enthalten. Dafür findet man bei Ph I im Gegensatz zum Fülberth'schen Phosphatid Glycin, Ph II enthält zusätzlich noch Threonin und Isoleucin. Die übrigen Aminosäuren stimmen überein. Am meisten unterscheiden sich die hydrophilen Bestandteile des Fülberth'schen Phosphatids einerseits und von Ph I sowie Ph II andererseits durch ihren Gehalt an Zuckern und Glycerin. Das Fülberth'sche Produkt enthält Zucker und kein Glycerin, für Ph I und Ph II gilt das Umgekehrte.

Völlig verschieden sind die lipophilen Anteile des Fülberth'schen Phosphatids im Gegensatz zu Ph I und Ph II. Erstere enthalten nur Cholesterin und keine Fettsäuren. Bei den beiden letzteren bilden diese jedoch den Hauptanteil der lipophilen Phase. -

Das Wollfett ist keine einheitlich zusammengesetzte Substanz. Je nach Herkunft, Gewinnung und Alter wird es eine unterschiedliche Zusammensetzung haben und damit variieren auch seine Einzelbestandteile

wie z.B. die Phosphatide.

Es ist nach diesen Untersuchungen anzunehmen, daß im Wollfett mehrere Vertreter dieser Verbindungsklassen vorkommen. Es besteht die Möglichkeit, daß der Peptidanteil derselben durch Abbau des Keratins entsteht und daß darauf die verschiedene Zusammensetzung zurückzuführen ist.

	Seite
4	<u>Beschreibung der Versuche</u> 81
4.1	Isolierung von Ph I und Ph II aus Wollfett 81
4.2	Bestimmung des Phosphorgehaltes der Wollfettsorten und von Ph I und Ph II 82
4.3	Chromatographie der Phospholipide 82
4.4	Untersuchung der Spaltprodukte von Ph I und Ph II 83
4.4.1	Hydrolysebedingungen 83
4.4.2	Aufarbeitung der Hydrolysate 84
4.4.2.1	Salzsaure Hydrolysate 84
4.4.2.2	Schwefelsaure Hydrolysate 84
4.4.2.3	Alkalische Hydrolysate 84
4.4.3	Chromatographie der Spaltprodukte 85
4.4.3.1	Hydrophile Bestandteile 85
4.4.3.2	Lipophile Bestandteile 86
4.4.4	Quantitative Bestimmung der Spaltprodukte von Ph I und Ph II 87
4.4.4.1	Inosit 87
4.4.4.2	Glyzerin 89
4.4.4.3	Aminosäuren 91
4.4.4.4	Cholesterin 92
4.4.4.5	Fettsäuren 93
4.5	Untersuchungen am Peptidbestandteil von Ph I und Ph II 93
4.5.1	Bestimmung der endständigen Aminosäure nach Sanger 93
4.5.1.1	Bereitung von Vergleichs-DNP-Aminosäuren nach Levy und Chung 93
4.5.1.2	Dinitrophenylierung von Ph I und Ph II 94
4.5.2	Bestimmung der C-terminalen Aminosäure nach Akabori 94
4.5.2.1	Herstellung von wasserfreiem Hydrazin 94
4.5.2.2	Umsetzung der Peptidreste von Ph I und Ph II mit wasserfreiem Hydrazin 95

4 Beschreibung der Versuche

Im experimentellen Teil wird eine Beschreibung der einzelnen Untersuchungen ohne Berücksichtigung erfolglos gebliebener Methoden gegeben.

4.1 Isolierung von Ph I und Ph II aus Wollfett

Die Gewinnung durch Extraktion mit Aceton und Äther sowie die Reinigung auf Kieselgelsäulen (Kieselgel zur Chromatographie, Merck, 0,2 - 0,5 mm) erfolgte nach der Vorschrift von Fülberth (2). Es sei deshalb auf diese Arbeit verwiesen.

Nur bei der Aufarbeitung von Ph II wurde insofern etwas von der Fülberth'schen Methode abgewichen, als bei der Soxhletextraktion zuerst mit kaltem Aceton gearbeitet wurde (s. Abbildung 23)

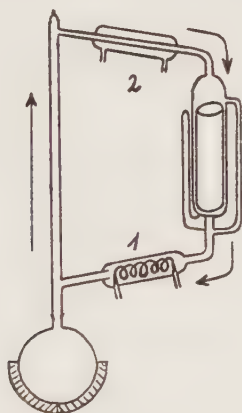


Abbildung 23

Die Pfeile an der Apparatur geben die Strömungsrichtung des Acetons an. Kühler 1 verhindert, daß Extraktionsflüssigkeit von unten (also warm) in den Soxhletapparat gelangt. Kühler 2 liefert kaltes Aceton,

welches sodann von oben einfließt.

Die Kaltextraktion erstreckte sich über etwa 230 Stunden, anschließend wurde noch 80 Stunden lang mit heißem Aceton ausgezogen. Weiterhin wurde wieder nach der Isolierungsmethode von Fülberth (2) verfahren.

4.2 Bestimmung des Phosphorgehaltes der Wollfettsorten und von Ph I und Ph II

Es kam die ebenfalls bei Fülberth (2) beschriebene kolorimetrische Halbmikromethode nach Becker und Krull (72) zur Anwendung.

4.3 Chromatographie der Phospholipide

Die dc Prüfung von Ph I und Ph II auf Einheitlichkeit und Reinheit erfolgte auf Glasplatten (22 x 20 cm), die mit einer ammoniumsulfathaltigen Kieselgel-G-Anreicherung bestrichen waren. Zur Herstellung zweier Platten wurden 25 g Kieselgel G mit einer Lösung von 1,5 g Ammoniumsulfat in 60 ml Wasser zu einem dünnen Brei angerieben, der sofort mit Hilfe eines Streichers gleichmäßig aufgetragen wurde. Die Adsorptionsschichten wurden zuerst an der Luft und danach 30 Min. lang bei 120° C getrocknet. Die in Chloroform gelösten Phospholipide (1%ige Lösungen) wurden 1,5 cm vom unteren Rand entfernt aufgetragen und in einer Glaskammer mit dem in Kapitel 3.2.1 angegebenen Fließmittel entwickelt. (Dauer etwa 1 1/2 - 2 Stunden, Laufstrecke: 15 cm).

Reagenzien zur Sichtbarmachung

Antimon-3-chloridlösung: Nach dem Besprühen mit 50%iger Antimon-3-chloridlösung in Eisessig wurde etwa 5 Min. lang auf 110° C erhitzt.

Ammoniummolybdatlösung: 0,3 g Ammoniummolybdat wurden in 25 ml destilliertem Wasser gelöst und die Lösung mit 3 ml n Salzsäure und

1, 5 ml Perchlorsäure (60%ig) versetzt.

Die mit diesem Reagenz besprühten Chromatogramme wurden 10 Min. lang einer Temperatur von 90° C ausgesetzt und bis zum Auftreten blauer Flecke mit ungefiltertem UV Licht bestrahlt (etwa 20 Min. lang).

4.4. Untersuchung der Spaltprodukte von Ph I und Ph II

Um zu den Spaltprodukten zu gelangen, mußten die beiden Phospholipide hydrolysiert werden. Die Hydrolysebedingungen richteten sich jeweils nach den zu identifizierenden Bestandteilen.

4.4.1 Hydrolysebedingungen

Nachzuweisende Substanzen	Hydrolysemittel	Temp. in °C	Dauer der Hydrolyse
Phosphorsäure Inosit-di-phosphorsäure Inosit-mono-phosphorsäure	4 n HCl	110°	1 Std.
Inosit	2 n H ₂ SO ₄ u. HJ (60%ig)	120° 120°	3 Std. 3 1/2 Std.
Glyzerin	alkohol. KOH (8%ig)	100°	10 Std.
Aminosäuren	10 n HCl u. Phenol	110°	20 Std.
Fettsäuren Cholesterin	alkohol. KOH (8%ig)	100°	9 St d.

5 - 10 mg von Ph I bzw. Ph II wurden jeweils mit 2 ml Verseifungsflüssigkeit in Glasröhrchen eingeschmolzen und im Trockenschrank bei der angegebenen Temperatur unter öfterem Umschütteln hydrolysiert.

4.4.2 Aufarbeitung der Hydrolysate

4.4.2.1 Salzsaure Hydrolysate

Das Hydrolysat wurde mit Wasser verdünnt, die lipophilen Bestandteile mit Äther ausgeschüttelt oder einfach abfiltriert. Der wässrige Anteil kam in ein flaches Schälchen und wurde im Vakuumexsikkator über KOH-Rotuli von HCl befreit.

4.4.2.2 Schwefelsaure Hydrolysate

Der mit Wasser verdünnte, hydrophile Anteil des schwefelsauren Hydrolysates wurde nach dem Entfernen der Fettbestandteile auf einer Ionenaustauschersäule neutralisiert. Es kam ein stark basischer Anionenaustauscher (Ionenaustauscher III, Merck) zur Anwendung (100, 101, 102). Die Säule (1,5 cm Durchmesser, 3 cm Höhe) wurde mit der zu neutralisierenden Lösung (etwa 5 ml) beschickt, und als diese (langsam) durchgetropft war, wurde noch mit 2 x 5 ml Wasser nachgewaschen. Das mit der neutralisierten Lösung vereinigte Waschwasser wurde eingengt und war sodann zu chromatographischen Untersuchungen verwendbar.

4.4.2.3 Alkalische Hydrolysate (Verseifung mit 8%iger äthanolischer KOH)

Nach beendeter Verseifung wurde der größte Teil des Äthanol im Vakuum verdampft, der Rückstand mit Wasser verdünnt und angesäuert (verd. H_2SO_4), wobei die Fettsäuren sich als weiße Flocken abschieden. Sie waren danach nebst Cholesterin (bei Ph II) mit Äther extrahierbar.

4.4.3 Chromatographie der Spaltprodukte

4.4.3.1 Hydrophile Bestandteile

Durchführung der Rundfiltermethode zum Nachweis von Phosphorsäure, Inosit-mono- und Inosit-di-phosphorsäure

Als Chromatographiekammer diente ein Exsikkator (Durchmesser: 15 cm), als Rundfilter ein kreisförmiger Papierbogen (Schleicher und Schüll, 2043b, G1) von 18 cm Durchmesser, der zwischen Deckel und Gefäßrand eingeklemmt werden konnte. In seinem Mittelpunkt wurde ein Kreis von 3 cm Durchmesser als Startlinie eingezeichnet, in dessen Zentrum das Verteilungsmittel durch einen aus 2 x 6 cm großen Filtrierpapierstreifen gewickelten Docht aus einer am Boden des Exsikkators stehenden Petrischale zugeführt wurde. Eine Stunde vor dem Ansatz des Chromatogramms wurde zu 74 ml frisch dest. Aceton 1 ml einer 0,1 m wäßrigen Lösung von Titriplex III (Merck) gegeben und anschließend mit 25%iger Trichloressigsäurelösung auf 100 ml aufgefüllt. Zum Entwickeln eines Rundfilterchromatogramms reichten etwa 25 ml Verteilungsmittel aus.

Die freien Inositphosphorsäuren wurden als Vergleichssubstanzen aus ihren Bariumsalzen mit Hilfe des Kationenaustauschers Amberlite IR - 120 gewonnen. Die Austauschersäulen wurden mit dem entsprechenden Bariumsalz beladen und die freien Säuren (Inosit-mono- und Inosit-di-phosphorsäure) mit 0,2 n HCl herausgelöst. Zur Chromatographie gelangten die im Vakuum eingeeengten Eluate.

Die Chromatographie der übrigen wasserlöslichen Spaltprodukte (Inosit, Glyzerin) erfolgte auf Schleicher und Schüll Papier Nr. 2043b, Mgl und Kieselgel G (Merck). Als Sprühmittel diente Silbernitratlösung. Sie war folgendermaßen zubereitet worden: 1 ml gesättigter wäßriger Silbernitratlösung wurde mit 20 ml Aceton zugesetzt. Danach kam tropfenweise soviel Wasser hinzu, bis sich

das ausgeschiedene Silbernitrat gerade wieder gelöst hatte. Zur Nachbehandlung kam das Chromatogramm für 30 Min. in eine mit Ammoniak gesättigte dunkle Kammer und wurde anschließend solange bei 80° C erwärmt, bis die dunklen Flecke deutlich zu erkennen waren.

4.4.3.2 Lipophile Bestandteile

Cholesterin

Der nach alkalischer Hydrolyse von Ph II verbliebene lipophile Anteil wurde auf Dünnschichtplatten (Herstellung s. 4.3) mit Chloroform entwickelt.

Als Sprühmittel kamen Antimon-3-chlorid (Herstellung s. 4.3) und Phosphorwolframsäurelösung zur Anwendung. Letztere bestand aus 10 g Phosphorwolframsäure, die in 100 ml Äthanol gelöst waren. Bei Erhitzen der besprühten Chromatogramme auf 100° C (10 Min.) entstand Rotviolett-Färbung.

Fettsäuren

Die pc Prüfung erfolgte auf mit Paraffinum liquidum imprägniertem Papier (Schleicher und Schüll, 2043b, Mgl). Als Fließmittel diente Eisessig. Zur Imprägnierung wurden die Papiere mehrmals durch eine 10%ige Lösung von Paraffinum liquidum in Äther gezogen und 15 Min. lang an der Luft getrocknet.

Die dc Untersuchung der Fettsäuren erfolgte auf Gipsschichten nach Kaufmann (96). Auf Mattglasscheiben (20 x 20 cm) von genau gleicher Dicke wurde mittels eines Dünnschichtstreichers eine dünnflüssige Gipsmasse (25 g Gips in 35 ml Wasser für 3 Glasscheiben 20 x 20 cm) in einem Zug aufgetragen. Die beschichteten Scheiben wurden 15 Min. lang bei Zimmertemperatur und danach 1 Stunde lang im Trockenschrank bei 80 - 90° C getrocknet. Nach dem Abkühlen im Exsikkator über P_2O_5 waren sie gebrauchsfertig.

Zur Hydrophobierung wurden die "Gipsplatten" in eine 10%ige Undecan (stand. Kaufmann) - Lösung in Petroläther (Sdp. 35 - 45° C) getaucht. Nach Verdunsten des Petroläthers und des über den Imprägnierungsgrad hinausgehenden Undecans (etwa 10 Min. bei Zimmertemperatur) konnten die zu trennenden Fettsäuren aufgetropft werden. Nach weiterem 10 Minuten langem Liegenlassen der Platten an der Luft wurde in aufsteigender Weise mit Eisessig entwickelt. Anschließend kamen die Chromatogramme für 1 Stunde in einen auf 80 - 90° C geheizten Trockenschrank, um das Fließmittel zu entfernen.

Zwecks Anfärbung wurden die abgekühlten Platten zuerst in Wasser, dann 10 Min. in eine Kupferacetatlösung (20 ml gesättigte wäßrige Kupferacetatlösung in 1000 ml Wasser) getaucht und danach 30 Min. lang mit fließendem Wasser ausgewaschen, um den Überschuß von Kupferacetat zu entfernen. Nun kamen sie für 10 Min. in eine 0,1%ige alkoholische Lösung von Rubeanwasserstoffsäure und wurden nochmals mit Wasser gewaschen. Es entstanden grüne Flecke auf weißem Hintergrund.

Die Anfärbung der Papierchromatogramme erfolgte in einer wäßrigen Rubeanwasserstoffsäurelösung (eine Spatelspitze davon auf 1000 ml Wasser).

4.4.4 Quantitative Bestimmung der Spaltprodukte von Ph I und Ph II

Alle beschriebenen Versuche zur quantitativen Bestimmung der Einzelbestandteile sind zwecks Absicherung der Ergebnisse mehrmals durchgeführt worden.

4.4.4.1 Inosit

Die Ermittlung des Inositgehaltes erfolgte nach Böhm und Richarz (74). Nach Hydrolyse (4.4.1) und Aufarbeitung des Hydrolysates (4.4.2.2) wurde Inosit pc abgetrennt (4.4.3.1). Dazu wurde das stark

eingeeingte Hydrolysat (s. oben) je zur Hälfte auf zwei Startpunkte eines Papierchromatogramms aufgetragen. Nach dem Entwickeln und Wegrocknen des Fließmittels (Butanol, Eisessig, Wasser 4 : 1 : 1) wurde der Bogen durchgeschnitten und das Inosit auf der einen Startbahn mit Silbernitrat lokalisiert. An genau der gleichen Stelle der anderen Bahn wurde eine Papierscheibe von der Größe des angefärbten Inositfleckes ausgeschnitten. Aus diesem Papierblättchen wurde der Inosit in einem Becherglas mit 1 x 5 ml und 4 x 2 ml Wasser warm herausgelöst.

Dieser Elutionslösung wurden nun in einem Jodzählkolben aus einer geeichten Pipette 2 ml einer etwa 0,01 m Perjodatlösung (2,94 g NaJO_4 in 30 ml 1 n H_2SO_4 gelöst und auf 1000 ml mit Wasser verdünnt) zugesetzt. Der verschlossene Kolben kam für 2 1/2 Stunden in einen auf 50° C geheizten Trockenschrank. Danach wurden 2 ml Phosphatpuffer (12 g krist. Dinatriumphosphat und 20 ml n H_2SO_4 mit Wasser auf 100 ml verdünnt) sowie 2 ml Kaliumjodidlösung (5 g Kaliumjodid und 100 ml halbgesättigte Kochsalzlösung) zugesetzt. Das in Freiheit gesetzte Jod wurde sofort mit 0,004 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung unter Verwendung von Stärke als Indikator titriert. Unter den gleichen Bedingungen wurde ein Blindversuch gemacht, bei dem ein ebenso großes Papierblättchen wie dasjenige, aus dem Inosit extrahiert worden war, verwendet wurde.

Berechnung:
$$\frac{(B - A) \cdot f}{C} = \text{mg Inosit}$$

B = Verbrauch an ml Thiosulfatlösung im Blindversuch
 A = Verbrauch an ml Thiosulfatlösung im Hauptversuch
 C = Äquivalent an ml Thiosulfat (0,004 n) für 1 mg Inosit
 (= 13,33 ml)
 f = Faktor uer 0,004 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung

Danach gilt für Ph I:

B = 26,9 ml
 A = 19,5 ml
 C = 13,33
 f = 1

$$\frac{(26,9 - 19,5) \cdot 1}{13,33} = 0,556 \text{ mg Inosit}$$

=====

Die Einwaage betrug 16,4 mg Ph I. Auf die Hälfte davon (8,2 mg) entfiel obiger Inositgehalt. Die andere Hälfte war getrennt aufgetragen und angefärbt worden.

0,556 mg in 8,2 mg Ph I = 6,8%.

Das entspricht 344 g oder etwa 2 Mol Inosit in 5050 g Ph I.

Für Ph II gilt:

B = 28,6 ml

A = 21,2 ml

C = 13,33

f = 1

$$\frac{(28,6 - 21,2) \cdot 1}{13,33} = 0,480 \text{ mg Inosit}$$

=====

Die Einwaage betrug 19,8 mg Ph II. Auf die Hälfte davon (9,9 mg) entfiel obiger Inositgehalt. Die andere Hälfte war getrennt aufgetragen und angefärbt worden.

0,480 mg in 9,9 mg Ph II = 4,85%.

Das entspricht 342 g oder etwa 2 Mol Inosit in 7120 g Ph II.

4.4.4.2 Glyzerin

Bestimmung in Phosphatiden nach Blix (76).

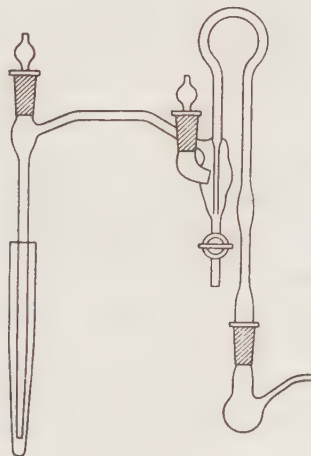


Abbildung 24

Apparatur zur Glyzerin-Bestimmung

Das Prinzip der Methode war schon in Kapitel 3.3.3.3 erläutert worden.

Ph I bzw. Ph II wurden in das Destillationskölbchen obenstehender Apparatur eingewogen. Dazu kamen 2 ml Jodwasserstoffsäure (60%ig). Als Waschflüssigkeit (in dem Gefäß mit Ablasshahn) dienten 0,3 ml 5%ige Natriumthiosulfatlösung. In der Vorlage befanden sich 3 ml 10%iges Natriumacetat in Eisessig und 5 Tropfen Brom. Nun wurde durch Eintauchen des Kölbchens in ein auf 120 - 125° C erhitztes Paraffinbad 3 1/2 Stunden lang im Stickstoff-Strom destilliert. Die Strömungsgeschwindigkeit regulierte ein Präzisionsquetschhahn so, daß immer eine Blase in die Lösung der Vorlage eintrat, sobald die vorhergehende die Oberfläche erreicht hatte. Zur Titration (103) wurde der Inhalt der Vorlage mit wenig Wasser in einen 50 ml Erlenmeyer-Kolben gespült, in welchen vorher 0,7 g Natriumacetat eingewogen und in wenig Wasser gelöst worden waren. Nun kamen 5 Tropfen 80 - 100 %ige Ameisensäure unter Umschütteln hinzu. Die bromfreie Lösung wurde mit 0,2 g Kaliumjodid und 0,5 ml 10%iger Schwefelsäure versetzt. Das in Freiheit gesetzte Jod wurde mit 0,03 n Natriumthiosulfatlösung unter Zugabe von 1 ml 1%iger Stärkelösung als Indikator titriert.

Berechnung: 1 ml 0,03 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ entspricht 0,514 mg Glyzerin

Ph I Einwaage 20,0 mg,

Verbrauch an 0,03 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$: 0,68 ml

$0,68 \times 0,514 = 0,354$

0,354 mg Glyzerin in 20 mg Ph I = 1,77%

Das entspricht 90,2 g oder 1 Mol Glyzerin in 5050 g Ph I.

Ph II Einwaage 36,0 mg
Verbrauch an 0,03 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$: 1,865 ml
 $1,865 \times 0,514 = 0,96$
0,96 mg Glyzerin in 36 mg Ph II = 2,66 %
Das entspricht 189,0 g oder 2 Mol Glyzerin in 7120 g Ph II.

4.4.4.3 Aminosäuren

Die Hydrolyse (6 n HCl, s. 4.4.1) erfolgte unter Phenolzusatz (3.3.3.4). Die in ein Reagenzröhrchen eingewogene Menge an Phosphatid wurde mit 1 ml 80 %igem wäßrigem Phenol versetzt und 5 Min. lang auf 60° C erwärmt. Nach Zugabe von 1,5 ml 10 n HCl konnte die Hydrolyse im zugeschmolzenen Röhrchen beginnen. Bei der qualitativen und quantitativen Analyse der verschiedenen Aminosäuren von Ph I und Ph II im Aminosäure-Analysiergerät (3.3.3.4) wurden folgende Lösungen benötigt:

Pufferlösungen

pH 2,2 ± 0,05	105 g Zitronensäure-Monohydrat + 42 g NaOH 97% + 80 ml HCl 32% + 5 l Wasser
pH 3,1 ± 0,02	210 g Zitronensäure-Monohydrat + 83 g NaOH 97% + 140 ml HCl 32% + 10 l Wasser + 50 ml BRLJ 35
pH 5,1 ± 0,02	105 g Zitronensäure-Monohydrat + 20 ml Eisessig + 47 g NaOH 97% + 136 g Natriumacetat · 3 H ₂ O + 10 l Wasser + 50 ml BRLJ 35
pH 7,0 ± 0,02	210 g Zitronensäure-Monohydrat + 120 g NaOH 97% + 5 l Wasser + 25 ml BRLJ 35

Die erste Pufferlösung (pH 2,2) diente zum Lösen und Aufbringen auf die Säule der Aminosäuremischung. Die zweite (pH 3,1) und dritte (pH 5,1) eluierten die neutralen Aminosäuren. Die letzte (pH 7,0) war zum Herauslösen basischer Aminosäuren aus der Säule vorgesehen.

Die Lösungen konnten durch Aufkochen luftfrei gemacht werden. Danach wurden den Puffern pH 3, 1 und pH 5, 1 noch je 50 ml Thiodiglykol p.a. pro 10 l Puffer zugesetzt.

Ninhydrin-Reagenz

314,5 g Natriumacetat · 3 H₂O und 62,5 ml Eisessig (pH 5,5) wurden mit destilliertem Wasser auf 625 ml aufgefüllt und in einem Kolben aufgekocht, wobei beim Abkühlen Stickstoff durchgeleitet wurde. - 1875 ml Methylglykol (im Vakuum über Eisen (II)-sulfat mittels einer Kolonne unter Stickstoff destilliert) wurden mit dem obigen Natriumacetat-Puffer gemischt. Die Verdrängung der Luft erfolgte durch Einleiten von gereinigtem Stickstoff. Danach wurden 50 g Ninhydrin der Mischung zugesetzt. Als sich das Ninhydrin vollkommen gelöst hatte, kamen noch 1,0 g SnCl₂ · 2 H₂O unter Umrühren hinzu. Anschließend wurde mit Paraffinöl überschichtet und im Kühlschrank aufbewahrt.

4.4.4.4 Cholesterin

Die Bestimmung erfolgte nach Jan e c k e und S e n f t (93). Die Isolierung des Cholesterins aus Ph II ist in Kapitel 3.3.5.1 beschrieben worden. Das in genau 10 ml Chloroform p.a. gelöste Sterin wurde mit genau 5 ml Liebermann - Burchard - Reagenz versetzt und 25 Min. lang in ein Wasserbad von 20 - 22° C (unter Lichtausschluß) eingestellt. Unter denselben Bedingungen wurde eine Blindprobe angesetzt, die an Stelle der Sterinlösung Chloroform enthielt. Die Extinktionsmessung erfolgte dann im Spektralphotometer von Zeiß-Opton in 10 mm Küvetten bei 625 nm gegen die Blindprobe. - Das hierzu verwendete Chloroform p.a. war zur Beseitigung seines Äthanolanteils dreimal mit Wasser ausgeschüttelt, über Natriumsulfat getrocknet und anschließend destilliert worden. Es wurde nur ein Chloroform verwendet, das bei 60 - 61° C übergang. Das Liebermann - Burchard Reagenz war nach dem Vorschlag

von Janecke und Senft (93) bereitet worden.

4.4.4.5 Fettsäuren

Die gravimetrische Bestimmung der einzelnen Säuren ist in Kapitel 3.3.5.2 beschrieben worden. Die Mikrobestimmung der Säure- und Hydroxylzahl erfolgte nach Gorbach (104/105).

Säurezahl

Verbrauch an 0,02 n KOH im Hauptversuch: 0,355 ml

Verbrauch an 0,02 n KOH im Blindversuch: -0,010 ml

0,345 ml

0,345 ml 0,02 n KOH = 0,0138 ml 0,5 n KOH.

$$SZ = \frac{0,0138 \cdot 28,05}{0,0021} = 183,8$$

=====

Hydroxylzahl

Verbrauch an 0,5 n KOH im Hauptversuch: 1,54 ml = a

Verbrauch an 0,5 n KOH im Blindversuch: 1,54 ml = b

Einwaage : 2,27 mg = E

$$OHZ = \frac{(b - a) \cdot 28,05}{E} + SZ$$

$$OHZ = 0 + SZ = 0 + 183,8$$

$$OHZ = 183,8$$

=====

4.5 Untersuchungen am Peptidbestandteil von Ph I und Ph II

4.5.1 Bestimmung der endständigen Aminosäure nach Sanger (80 - 83) mit 2,4 - Dinitrofluorbenzol (DNFB)

4.5.1.1 Bereitung von Vergleichs-DNP-Aminosäuren nach Levy und Chung (86)

Der Lösung von 5 mMol der jeweils zur Umsetzung vorgesehenen

Aminosäure und 1 g wasserfreiem Natriumkarbonat in 20 ml dest. Wasser wurden 5 mMol 2,4-Dinitrofluorbenzol (DNFB) in Form einer 10%igen acetonischen Lösung zugesetzt. Nach 1 1/2 stündigem Schütteln der Suspension bei 40° C im Dunkeln war der größte Teil der DNFB-Tröpfchen verschwunden. Die Entfernung von nicht umgesetztem DNFB erfolgte durch Ausschütteln mit Äther. Nach dem Ansäuern der wäßrigen Lösung mit 1 ml konzentrierter Salzsäure wurde die betreffende ausgefallene DNP-Aminosäure mit Äther extrahiert, die beim Verdampfen des Äthers auskristallisierte.

4.5.1.2 Dinitrophenylierung von Ph I und Ph II

Es kam das etwas abgeänderte Verfahren von Lockhart und Abraham (87) zur Anwendung. - Etwa 2 mg Substanz wurden in 5 ml absolutem Alkohol, der 5 % Dinitrofluorbenzol enthielt, mit 50 mg Natriumkarbonat sicc. versetzt. Das Gemisch wurde in ein Reagenzglas eingeschmolzen und bei 40° C im Dunkeln 2 Stunden lang maschinell geschüttelt. Zur Entfernung des Alkohols kam das geöffnete Glas in einen Vakuumexsikkator. Überschüssiges DNFB ließ sich durch Ausschütteln des Reaktionsgemisches mit Äther entfernen. Danach wurde der Rückstand in 1 ml 6 n HCl aufgenommen, unter Stickstoff eingeschmolzen, 9 Stunden lang auf 105° C erhitzt und das Hydrolysat mit der doppelten Menge an Wasser verdünnt. Daraus konnte DNP-Alanin durch Ausschütteln mit Äther erhalten werden.

4.5.2 Bestimmung der C-terminalen Aminosäure nach Akabori (88/89)

4.5.2.1 Herstellung von wasserfreiem Hydrazin

25 g Hydrazinhydrat (80 %ig), 250 g Toluol und 250 g Calciumoxid wurden gemischt und über Nacht stehengelassen. Gegen Luftfeuchtigkeit geschützt wurde die Mischung sodann 3 Stunden lang unter Rückflußkühlung erhitzt und als azeotropes Gemisch bei 93 - 94° C überdestilliert. Die untere Schicht des Destillates war wasserfreies

Hydrazin und konnte nun ohne weitere Reinigung benutzt werden.

4.5.2.2 Umsetzung der Peptidreste von Ph I und Ph II mit wasserfreiem Hydrazin

Die Peptidanteile wurden in der in Kapitel 3.4.4.2 beschriebenen Weise von etwa 20 mg Ph I bzw. Ph II abgespalten und mit 1 g wasserfreiem Hydrazin 10 Stunden lang auf 100° C erhitzt (Rückfluß). Das Reaktionsgemisch wurde nun in einem Vakuumexsikkator über konzentrierter Schwefelsäure von überschüssigem Hydrazin befreit, der Rückstand in 15 ml 2 %iger wäßriger Natriumbikarbonatlösung gelöst und mit 30 ml 1 %igem DNFB in Äthanol versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 2 Stunden lang bei Raumtemperatur geschüttelt, mit 45 ml Wasser versetzt und mit verdünnter Salzsäure angesäuert. Die ausgefallenen DNP-Derivate konnten mit Äthylacetat extrahiert werden. Die sauren DNP-Derivate (wie Di-DNP-Glutaminsäuremonohydrazid, Di-DNP-Asparaginsäuremonohydrazid und das DNP-Derivat der C-terminalen Aminosäure) wurden mit 2 %iger Natriumbikarbonatlösung aus dem Äthylacetat reextrahiert, durch Ansäuern (verd. HCl) ausgefällt und wieder mit Essigsäureäthylester ausgeschüttelt. Nach Verjagen des Esters konnte das DNP-Derivat der C-terminalen Aminosäure (Serin) identifiziert werden (s. Kapitel 3.4.4.2).

Zusammenfassung

1. Aus einer englischen und einer italienischen Wollfettsorte war je ein Phospholipid isoliert worden nach einer von Fülberth (2) angegebenen Methode.
2. Auf Grund ihrer Zusammensetzung erhielten sie die Bezeichnungen Phospho-inosito-glyzero-lipid I (MG 5050), abgekürzt Ph I und Phospho-inosito-glyzero-lipid II (MG 7120), abgekürzt Ph II.
3. Es handelt sich um einheitliche Substanzen, wie verschiedene Untersuchungen zeigten. Die Einzelbestandteile beider waren erst nach saurer oder basischer Hydrolyse nachzuweisen.
4. An hydrophilen Spaltprodukten enthalten die beiden Phospholipide: Inosit, Phosphorsäure, Glycerin und verschiedene Aminosäuren.
5. Als lipophile Bestandteile waren nachzuweisen:
Ph I : Cerotinsäure, Lignocerinsäure, Stearinsäure, Palmitinsäure und 12-Hydroxystearinsäure.
Ph II : Cerotinsäure, Lignocerinsäure, 12-Hydroxystearinsäure und Cholesterin.
6. Auf Grund von partiellen hydrolytischen Spaltungen wird angenommen, daß beide Phospholipide eine phosphatidylinositartige Grundstruktur besitzen. Die Fettsäuren sind mit Glycerin und Inosit verestert und die Aminosäuren als Peptid über Serin an Phosphorsäure gebunden. Cholesterin liegt in Ph II ebenfalls mit Phosphorsäure verestert vor.
7. Emulgatorwirkung
Eine Anreibung von 50 mg Ph I bzw. Ph II in 5 g Paraffinum liquidum bildete mit Wasser nach feiner Verteilung im Homogenisator eine weiße Emulsion. Diese enthielt 36% Wasser. Die Bestimmung des Wasseranteiles erfolgte mit dem Plan-Wägegglas nach Heidbrink (106, 107, 108).

6 Literaturverzeichnis

- | | | |
|--------|---|---|
| (1) | G. Senft | Dissertation, Frankfurt a.M. (1956) |
| (2) | W. Fülberth | Dissertation, Frankfurt a.M. (1962) |
| (3) | D. J. Hanahan | Lipide Chemistry, John Wiley & Sons, Inc., New York (1960) |
| (4) | W. Schrade
G. Becker | Klin. Wochschr. <u>32</u> , 27 (1954) |
| (5) | E. Baer
A. Zschocke | J. biol. Chemistry <u>236</u> , 1273 (1961) |
| (6) | H. Rosenberg
A. H. Ennor
D. D. Hagermann
S. Sugai | Biochem. J. <u>84</u> , 536-541 (1962) |
| (7) | G. V. Marinetti
J. Erbland
E. Stotz | J. biol. Chemistry <u>233</u> , 562 (1958)
J. Amer. Oil Chemists' Soc. <u>36</u> , 41 (1959) |
| (8) | H. P. Schwarz
L. Dreisbach
R. Stambaugh
A. Kleschick
M. Barrionuevo | Arch. Biochem. Biophysics <u>87</u> , 171 (1960) |
| (9) | A. A. Benson
B. Maruo | Biochim. et Biophys. Acta <u>27</u> , 189 (1958) |
| (10) | G. V. Marinetti
J. Erbland
M. Albrecht
E. Stotz | Biochim. et Biophys. Acta <u>30</u> , 543 (1958) |
| (11) | F. D. Collins | Nature (London) <u>188</u> , 297 (1960) |
| (12) | C. H. Lea
D. N. Rhodes
R. D. Stoll | Biochem. J. <u>60</u> , 353, (1955) |
| (13) | G. V. Marinetti
J. Erbland
E. Stotz | Biochim. et Biophys. Acta <u>30</u> , 642 (1958) |
| (14) | J. Polnoviski
L. Douste-Blazy | "Biochemical Problems of Lipids", 64
(Butterworths Sci. Pub., London, 1956) |
| (15) | F. D. Collins | Biochem. J. <u>72</u> , 532 (1959) |

- (16) J. C. Dittmer Biochem. J. 81, 535 (1961)
R. M. C. Dawson
- (17) K. Nielsen J. Amer. Oil Chemists' Soc. 37, 217 (1960)
- (18) E. Vilkas } in J. Asselineau, Les Lipides bactériens,
(19) M. C. Pangborn } Hermann, Paris (1962) S. 167
- (20) S. Nojima J. Biochem. (Japan) 46, 607 (1959)
- (21) H. M. Rauen Biochemisches Taschenbuch, 2. Auflage,
1. Teil, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-
Heidelberg 1964
- (22) H. Wagner Fette, Seifen, Anstrichmittel 62, 1115 (1960)
- (23) H. E. Carter J. biol. Chemistry 233, 1309 (1958)
R. A. Gigg
J. H. Law
T. Nakayama
E. Weber
- (24) H. E. Carter J. Amer. Oil Chemists' Soc. 25, 335 (1958)
W. D. Celmer
D. S. Galanos
R. H. Gigg
W. E. M. Lands
J. H. Law
K. L. Mueller
T. Nakayama
H. H. Tomizawa
E. Weber
- (25) G. Rousser J. Amer. Oil Chemists' Soc. 40, 425 (1963)
G. Kritchevsky
D. Heller
E. Lieber
- (26) A. Nowotny Biochem. Z. 330, 47 (1958)
O. Lüderitz
O. Westphal
- (27) I. Fromme Pharm. Acta Helv. 33, 391 (1958)
O. Lüderitz
A. Nowotny
O. Westphal
- (28) A. Nowotny J. Am. Chem. Soc. 83, 501 (1961)
- (29) F. R. N. Gurd in: D. J. Hanahan (Ed.), Lipid Chemistry,
John Wiley, New York, 1960

- (49) K. S. Ambe Science, 129, 98 (1959)
F. L. Crane
- (50) M. Reich J. biol. Chemistry 236, 3058 (1961)
W. W. Wainio
- (51) S. Fleischer J. biol. Chemistry 236, 2936 (1961)
H. Klouwen
G. Brierley
- (52) E. Tria Ber. wiss. Biol. 169, 242 (1962)
O. Barnabei
- (53) E. Stahl Dünnschicht-Chromatographie, Springer
Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962)
- (54) V. Skipski J. Lipid Res. im Druck
R. P. Peterson
M. Barclay
- (55) A. Chalvardjian J. Nutrition 76, 52 (1962)
L. J. Morris
R. T. Holman
- (56) W. Schlemmer Boll. Soc. ital. Biol. Sperm. 37, 134 (1961)
- (57) T. Svedberg Die Ultrazentrifuge, Hdb. d. Kolloidwissen-
K. O. Pedersen schaft, Bd. 7, Dresden 1940 (Monographie)
- (58) H. K. Schachmann Ultracentrifugation in Biochemistry, New
York, London 1959 (Monographie)
- (59) H. K. Schachmann Ultracentrifugation, Diffusion and Viscometry,
in Methods in Enzymology, New York 1957,
Bd. IV, S. 32 ff.
- (60) J. B. Nichols Determinations with the Ultracentrifuge, in
E. D. Bailey Technique of Organic Chemistry, 3. Aufl.,
Bd. I/2, S. 1007, New York, London 1960
- (61) S. Claesson Ultracentrifugation, in Analytical Methods of
I. Moring-Claesson Protein Chemistry, Bd. 3, S. 121-171, Oxford,
London, New York, Paris 1961
- (62) T. A. Williams Ultracentrifugal Analysis in Theory and
Experiment, New York, London 1963
- (63) G. Meyerhoff Ultrazentrifuge, in Houben-Weyl, Methoden
der organischen Chemie, 4 Aufl., Bd. III/1,
S. 390-408, Stuttgart 1955
- (64) E. Hellman Die Ultrazentrifuge, in Hoppe-Seyler/Thier-
felder, 10. Aufl., Bd. I/1, S. 95-121, Berlin-
Göttingen-Heidelberg 1953

- (65) R. Jaenicke in: H. M. Rauen, Biochemisches Taschenbuch, 2. Aufl., 2. Teil, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1964
- (66) J. T. Edsall Size, Shape and Hydration of Protein Molecules, in The Proteins, Bd. I/B, S. 649 ff., New York 1953
- (67) J. Hengstenberg Sedimentation und Diffusion von Makromolekülen, in Physik der Hochpolymeren, Bd. 2, S. 411-494, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1953
- (68) W. J. Archibald J. phys. Colloid Chem. 51, 1204 (1947)
- (69) S. M. Klainer
G. Kegeles J. phys. Chem. 59, 952 (1955)
- (70) A. P. Brady
H. Huff
J. W. Mc Bain J. Phys. & Coll. Chem. 55, 304 (1951)
- (71) J. Kjeldahl Z. analyt. Chem. 22, 366 (1883)
- (72) E. Becker
L. Krull Fette, Seifen, Anstrichmittel 60, 447 (1958)
- (73) J. Schormüller
G. Würdig Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forschung 105, 397-403 (1957)
- (74) P. Böhm
G. Richarz Hoppe - Seyler's Z. physiol. Chem. 298 Bd. (1954)
- (75) P. Fleury
P. Balatre Les inositols, chimie et biochimie, Masson, Paris (1947)
- (76) G. Blix Mikrochim. Acta 1, 75 (1937) u. in H. P. Kaufmann, Analyse der Fette und Fettprodukte, Bd. I, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1958)
- (77) I. M. Hais
K. Macek Handbuch der Papierchromatographie, Bd. I, G. Fischer Verlag, Jena (1958)
- (78) F. Drawert
K. H. Reuther Angew. Chem., 75, 169, (1963)
- (79) K. Hannig Clinica Chimica Acta 4, 51 (1959)
- (80) F. Sanger Biochem. J. 39, 507 (1945)
- (81) F. Sanger Biochem. J. 40, 261 (1946)
- (82) F. Sanger Biochem. J. 45, 562 (1949)
- (83) R. Porter
F. Sanger Biochem. J. 42, 287 (1948)

- (101) R. Griessbach Austauschadsorption in Theorie und Praxis,
Akademie-Verlag, Berlin (1957)
- (102) F. Helffrich Ionenaustauscher, Bd. I. Verlag Chemie,
Weinheim/Bergstrasse (1959)
- (103) F. Vieböck Ber. dtsch. chem. Ges. 63, 3207 (1930)
C. Brecher
- (104) G. Gorbach Fette u. Seifen 47, 499 (1940)
- (105) J. Grossfeld Z. Unters. Lebensmittel 62, 441 (1931)
- (106) W. Heidbrink Fette u. Seifen 53, 291 (1951)
- (107) H. Schmalfuß Fette u. Seifen 53, 619 (1951)
- (108) H. Schmalfuß Fette u. Seifen 54, 87/89 (1952)
- (109) L.P. Metcalfe Analytic. Chem. 33, 363 (1961)
A.A. Schmitz
- (110) E. Bayer Gaschromatographie, Springer-Verlag,
Berlin-Göttingen-Heidelberg (1959)

LEBENS LAUF

Am 11. Juni 1936 wurde ich, Karl Schaffnit, als Sohn des Apothekers Dr. Karl Schaffnit und seiner Ehefrau Anneliese, geb. Kohlhaas, in Frankfurt a. M. geboren. Vier Jahre lang besuchte ich die Volksschule und ab Herbst 1946 bis zur Ablegung der Reifeprüfung am 29. Februar 1956 das Realgymnasium zu Waldmichelbach im Odenwald. Die zweijährige Praktikantenzeit absolvierte ich in der Apotheke am Bahnhof in Alsfeld in Oberhessen und bestand im März 1958 das Pharmazeutische Vorexamen in Darmstadt. Im Sommersemester 1958 begann ich mit dem Studium der Pharmazie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt a. M. und legte im April 1961 die Pharmazeutische Prüfung ab. Danach war ich ein halbes Jahr in der väterlichen Apotheke in Waldmichelbach im Odenwald tätig. Im Wintersemester 1961/62 begann ich mit der Anfertigung meiner Dissertation am Pharmazeutischen Institut der Universität Frankfurt unter der Leitung von Herrn Professor Dr. H. Janecke. Die Approbation als Apotheker erhielt ich im Frühjahr 1962.

Meinem hochverehrten Lehrer und Doktorvater, Herrn Professor Dr. H. Janecke, bin ich für die wertvolle Unterstützung und die vielseitigen Anregungen bei der Anfertigung dieser Arbeit zu tiefem Dank verpflichtet.

Dem Direktor des Pharmazeutischen Instituts, meinem sehr verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. C. Rohmann, sage ich meinen aufrichtigen Dank für sein stets freundliches Entgegenkommen und seine Unterstützung, wodurch mir die Ausführung der Arbeit in seinem Institut ermöglicht wurde.

